

Fernando Pérez Rodríguez



**Evaluación Cuantitativa del
Riesgo Microbiano en productos
cárnicos cocidos: Modelos de
contaminación cruzada y su impacto
sobre la Gestión del Riesgo**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos

Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos



**EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL RIESGO
MICROBIANO EN PRODUCTOS CÁRNICOS
COCIDOS: MODELOS DE CONTAMINACIÓN
CRUZADA Y SU IMPACTO SOBRE LA GESTIÓN DEL
RIESGO**

TESIS DOCTORAL
Fernando Pérez Rodríguez

Directores:

Dr. D. Gonzalo Zurera Cosano
Dra. D^a Rosa María García-Gimeno

Córdoba, Diciembre 2006

“Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano en productos Cárnicos
Cocidos: Modelos de Contaminación cruzada y su impacto sobre la
Gestión del Riesgo”

Tesis que presenta el Licenciado D. Fernando Pérez Rodríguez para optar
al grado de Doctor

El Doctorando

Fdo. Fernando Pérez Rodríguez

VºBº

Los Directores

Fdo. Prof. Dr Gonzalo Zurera Cosano Fdo. Profa. Dra. Rosa Mª García Gimeno

GONZALO ZURERA COSANO Y ROSA MARÍA GARCÍA GIMENO
PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por el Licenciado D. Fernando Pérez Rodríguez con el título “Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano en productos Cárnicos Cocidos: Modelos de Contaminación Cruzada y su impacto sobre la Gestión del Riesgo” se ha desarrollado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, durante los años 2003, 2004, 2005 y 2006, considerando que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente informe en Córdoba a 20 de diciembre de 2006.

Fdo. Prof. Dr Gonzalo Zurera Cosano

Fdo. Profa. Dra. Rosa M^a García Gimeno

“Y yo me rompo el alma contra
los horizontes de la vida”
(Manuel Altolaguirre)

A mi familia,
por su constante apoyo

Agradecimientos

Entre la demora y prisas de la Tesis, aquí me veo, un par de horas antes de su nacimiento en libro, escribiendo lo que tanto deseaba hacer. El agradecimiento más sincero no está en la palabra sino en el gesto, en la mirada, en el abrazo, el beso... Así, mis más sinceros agradecimientos a:

Al Profesor Dr. D. Gonzalo Zurera Cosano, por su confianza depositada en mí, por las largas y provechosas conversaciones en su despacho, y por su constante apoyo y dedicación a lo largo del sinuoso transcurrir de esta Tesis.

A la Profesora Dr. Dña. Rosa María García Gimeno por su comprensión en todo momento, por los conocimientos que me ha transmitido, y las continuas ideas y soluciones que han servido para la consecución de esta Tesis.

Al Profesor Dr. D. Manuel Ángel Amaro López por haber sido la primera persona que me inició en los caminos de la investigación, por sus cafés ultrarrápidos, pero sentidos y divertidos, y por sus fundamentos de baloncesto en la zona.

A todos los demás miembros del Departamento, por todos los momentos que hemos compartidos.

A Fernando Cámara, Elena Carrasco, Antonio Valero y Rafa Ventura porque cada uno en su camino me enseñó lo maravilloso de la amistad, por las mil historias vividas juntos, por los abrazos, y por TODO.

A todos mis amigos de aquí y de allí, con todo mi cariño y amistad, por ser como son, y por quererme siempre siendo como soy.

A EVA por su amor, por su incansable apoyo, por escucharme, por creerme, por sus abrazos..., por haber sido TODO para mí durante estos años.

A mis padres Fernando e Isabel por creer siempre en mí, por ser un ejemplo de dedicación y honestidad, por el amor recibido, y por su incansable e incondicional apoyo que siempre me acompañará allí donde vaya.

A mis hermanos porque siempre han estado conmigo a lo largo de estos años de Tesis, por ser incondicionales míos, porque los QUIERO.

Finalmente, al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de la Beca de Formación de Personal Investigador disfrutada durante el desarrollo de la presente Tesis.

Índice

Introducción.....	1
-------------------	---

I. BASES CONCEPTUALES Y METODOLÓGICAS

1. Una visión global de la gestión de la seguridad alimentaria	5
1.1 Primero fue el riesgo, y después los sistemas de gestión	5
1.2. Antecedentes de los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria	5
1.3. Necesidad de un nuevo enfoque de gestión de la seguridad alimentaria.....	6
1.3.1. El Análisis de Riesgos	7
2. Nuevas perspectivas en la gestión de la seguridad microbiológica de los alimentos.....	11
2.1. Objetivos de salud pública: “tan bajo como razonablemente alcanzable” (ALARA) y “nivel adecuado de protección” (ALOP)	11
2.2. Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO)	13
2.2.1. FSO en un marco de Gestión del Riesgo Microbiano	14
2.2.2. Desarrollo matemático del concepto FSO	14
2.2.3. Estimando un FSO a través de la Evaluación del Riesgo Microbiano en alimentos	15
2.3. Integración del FSO en la cadena alimentaria	16
2.4. Criterios Microbiológicos	17
2.5. ALOP/FSO en el marco internacional	19
2.6. Etapas de la Gestión del Riesgo Microbiano	21
2.7. Validación y verificación de un sistema de Gestión del Riesgo Microbiano ..	24
3. La Evaluación del Riesgo Microbiano.....	27
3.1. Identificación del Peligro	28
3.2. Caracterización del Peligro.....	29
3.3. Evaluación de la Exposición.....	30
3.4. Caracterización del Riesgo.....	31
4. Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano	33
4.1. Modelos de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano en alimentos (ECRM).....	34
4.2. Utilización de distribuciones de probabilidad en la ECRM.....	35
4.3. Importancia de considerar variabilidad e incertidumbre en la ECRM.....	37
4.4. Avances en el desarrollo de la ECRM	39
4.5. Tipos de modelos en la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano	43
4.5.1. Modelos cinéticos.....	44
4.5.2. Modelos de crecimiento/no crecimiento y modelos de probabilidad ...	52
4.5.3. Modelos Dosis-Respuesta	54
4.5.4. Modelos de recontaminación y/o contaminación cruzada.....	58

4.6. La validación: Un paso necesario en la aplicación de modelos.....	60
5. Tratamiento de los datos en la ECRM y su incorporación mediante distribuciones de probabilidad	63
5.1. Fuentes de información para la ECRM	63
5.2. Calidad de los datos en la ECRM.....	65
5.3. Definiendo las variables de un modelo de ECRM.....	67
5.4. Distribuciones de probabilidad.....	69
5.4.1. Distribuciones continuas	70
5.4.2. Distribuciones discretas	78
6. Análisis de sensibilidad	83
6.1. Clasificación y tipos de métodos de sensibilidad en modelos de ECRM.....	83
6.2. Análisis de Correlación y Regresión: Gráficos de Tornado	87
6.3. Análisis de varianza (ANOVA/MANOVA).....	89
6.4. Diagramas de dispersión.....	91
6.5. Otras consideraciones	92
7. Comunicación del Riesgo	93
7.1. Percepción y dimensiones del riesgo.....	93
7.2. Comunicación del riesgo	94
7.2.1. Audiencia.....	94
7.2.2. Mensaje.....	95
7.2.3. El medio	95
7.3. Directrices de la FAO/WHO respecto a la Comunicación del Riesgo microbiano en alimentos	96
7.3.1. Objetivos del proceso de comunicación del riesgo.....	96
7.3.3. Barreras para una comunicación del riesgo efectiva	98
Referencias.....	99

II. OBJETIVOS

Objetivos	111
-----------------	-----

III. RESULTADOS

1. Contaminación cruzada: Factores de riesgo y modelos matemáticos.....	113
---	-----

Understanding and Modelling Bacterial Transfer in Foods: A Review	115
---	-----

1.1 Abstract.....	115
1.2. Introduction	115



1.3. Investigating Bacterial Transfer	117
1.3.1. Types of studies	117
1.3.2. Recovery methods: limitations and alternatives.....	120
1.3.3. Microorganisms	120
1.3.4. Transfer measure: transfer rate (TR)	120
1.4. Factors Governing Bacterial Transfer	121
1.4.1. Environmental factors	122
1.4.2. Intrinsic factors (specie).....	124
1.4.3. By identifying the determinant factors, risk can be located and reduced	125
1.5. SFC Transfer Models	126
1.5.1. General view.....	126
1.5.2. Integrating bacterial transfer models in a QMRA framework.....	128
1.6. Conclusions	130
1.7. References.....	131
2. Desarrollo de modelos de contaminación cruzada	141
Modeling transfer of <i>Echerichia coli</i> O57:H7 and <i>Saphylococcus aureus</i> during slicing of a cooked meat product	143
2.1. Abstract.....	143
2.2 Introduction	143
2.3. Material and Methods	144
2.3.1. Inoculum preparation	144
2.3.2. Slicing Machine and Artificial contamination	145
2.3.3. Transfer of <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i> O157:H7 from contaminated blade at different inoculum levels via the slicer to uninoculated cooked meat product by slicing.....	145
2.3.4. Estimation of the force or pressure applied during slicing	145
2.3.5. Microbiological Analysis.....	145
2.3.6. Data and statistical analysis	146
2.3.7. Mathematical models	147
2.4. Results and discussion	148
2.4.1. Low transfer ability.....	148
2.4.2. Logarithmic decrease during slicing.....	149
2.4.3. Influence of microorganism type and inoculum size on transfer coefficients.....	151
2.4.4. An example of modeling transfer data for the QMRA	152
2.5. Conclusions	153
2.6. References.....	154
3. Incorporación de modelos de contaminación cruzada en la ECRM y su impacto sobre la Gestión del Riesgo	159

Linking Quantitative Exposure Assessment and Risk Management by means of the FSO concept: an example for *Listeria monocytogenes* in different cross-contamination scenarios 161

3.1. Abstract	161
3.2. Introduction	161
3.3. Material and Methods	162
3.3.1. Scope of the model.....	162
3.3.2. Modeling - Retail phase	163
3.3.3. Modeling Storage phase	166
3.3.4. Building up a risk ranking of the scenarios by applying a FSO	169
3.3.5. Simulation Analysis	169
3.3.6. Statistical Analysis	169
3.3.7. Applying the ICMSF food safety management scheme.....	170
3.4. Results and discussion	170
3.4.1. Outcome of the Model	170
3.4.2. Performing a risk ranking	170
3.4.3. Differences in the concentration level (N) between scenarios.....	171
3.4.4. Efficacy of Hand-Washing versus Use of Gloves.....	173
3.4.5. Significant variables in the scenarios	173
3.4.6. Establishing an effective reduction rate for hand washing procedures.....	174
3.5. Conclusions.....	176
3.6. References	177

4. Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano en alimentos y aplicación de métodos de análisis de sensibilidad..... 181

Extracting risk managers-information from a Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in deli meats..... 183

4.1. Abstract.....	183
4.2. Introduction	183
4.3. Material and Methods	184
4.3.1. Scope of the model.....	184
4.3.2. Exposure Assessment	185
4.3.3. Exposure Assessment:prevalence and concentration at retail.....	186
4.3.4. Exposure Assessment:refrigerator temperature and storage time	187
4.3.5. Exposure Assessment:serving size.....	189
4.3.6. Exposure Assessment:variability and uncertainty of exponential growth rate (EGR)	189
4.3.7. Exposure Assessment:maximal population density	189
4.3.8. Hazard characterization	190
4.3.8. Risk characterization	190
4.3.9. Estimating number of cases per year in a probabilistic framework	191
4.3.10. Gaining insight of the inputs: which inputs are responsible for risk?	191
4.3.11. Simulation of the model	193
4.4. Results and discussion	195

4.4.1. Output of the model.....	195
4.4.2. Risk is determined by the extreme doses at consumption.....	195
4.4.3. Concentration at retail.....	197
4.4.4. Evaluating the effect of values $\ll 1$ CFU/g at retail on risk estimation.....	200
4.4.5. Refrigerator temperature and storage time.....	201
4.4.6. Serving Size.....	204
4.4.6. Importance of Maximal Population Density in risk estimation.....	205
4.4.7. Effect of uncertainty on number of cases estimate.....	208
4.5. Conclusions.....	210
4.6. References.....	211

IV. DISCUSIÓN GENERAL

1. <i>Listeria monocytogenes</i> : El riesgo está en los extremos de la distribución de dosis.....	213
2. Importancia de la refrigeración a nivel doméstico en la incidencia de la listeriosis.....	214
3. Densidad máxima de población.....	216
3.1. Modelos de densidad máxima de población en la ECRM.....	218
4. Estrategias para el control de <i>Listeria</i>	220
4.1 ¿Cuál es el enfoque correcto para la disminución del número de casos de listeriosis?.....	220
5. La Transferencia microbiana: Factores de riesgo.....	224
6. Aspectos clave para incluir modelos de transferencia microbiana en la ECRM.....	226
7. Eficacia del lavado de manos y del uso de guantes.....	228
8. Transferencia de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 durante el loncheado de productos cárnicos cocidos.....	230
Referencias.....	235

V. CONCLUSIONES

Conclusiones.....	245
-------------------	-----

GLOSARIO247

I. INTRODUCCIÓN

Introducción

En los últimos años, la confianza de los consumidores en la seguridad de los productos alimenticios se ha visto a veces alterada por el efecto acumulativo de las crisis sanitarias relacionadas con los alimentos. La industrialización del sector alimentario y el gran desarrollo del comercio internacional han posibilitado que los productos alimenticios puedan ser distribuidos a cualquier parte del mundo en relativamente poco tiempo. Los peligros biológicos, químicos y físicos pueden ahora, por tanto, alcanzar distintas poblaciones con distinta susceptibilidad y diferentes patrones de consumo con el consecuente riesgo sobre la salud que esto supone. Además del coste sanitario, las pérdidas económicas y políticas son de gran relevancia en un mundo cada vez más dominado por una economía global. Para hacer frente a esta situación, se ha desarrollado un esquema de gestión del riesgo fundamentado en la aplicación del método científico: **Análisis de Riesgos**.

La base científica en el Análisis de Riesgo se aborda en la etapa de **Evaluación del Riesgo**, cuyos resultados sustentan las posibles decisiones y políticas nacionales e internacionales en cuanto a un determinado peligro o riesgo alimentario. Sin embargo, aunque en otros campos estos sistemas ya han alcanzado una cierta madurez, tanto en sus bases como en su aplicación, en el ámbito de la microbiología alimentaria se presenta como un aspecto nuevo y poco desarrollado, aunque prometedor en cuanto a su potencial en la gestión del riesgo alimentario.

En España, el avance en este ámbito es aún, si cabe, menos importante, si lo comparamos con el mostrado por otros países del entorno europeo. Con el propósito de avanzar en esta nueva área, la presente Tesis doctoral intenta profundizar en los aspectos metodológicos de la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM) empleando, como un caso estudio, *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos cocidos. El presente trabajo también aborda el estudio de la contaminación cruzada como un factor de importancia en la aparición de toxiinfecciones alimentarias e investiga el desarrollo de modelos matemáticos de *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* para su inclusión en los estudios de ECRM.

Para ello, esta se presenta en la modalidad de “compendio de publicaciones” de acuerdo con el Real Decreto 56/2005 del 21 de enero y conforme al Artículo 33 del Título V de la *Normas Regulatoras de los Estudios de Doctorado de la Universidad de Córdoba*, relativa a sus preparación, presentación, lectura y nombramiento de los tribunales de Tesis doctoral. Los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a la confección de 4 artículos científicos descritos en los Capítulos 1-4 del bloque de Resultados. Al comienzo de cada uno de estos capítulos se presenta un resumen introductorio donde se incluye los objetivos y aspectos más importantes de cada publicación.

El trabajo se encuentra estructurado en 5 bloques temáticos: Bases metodológicas y conceptuales, Objetivos, Resultados, Discusión general y Conclusiones.

En el bloque de *Bases metodológicas y conceptuales* se realiza una completa revisión sobre el Análisis de Riesgos y sus componentes, centrándonos en las nuevas herramientas de **Gestión del Riesgo (GR)**, como los **Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO)** y a otros conceptos derivados (Capítulos 1 y 2). La parte central de este bloque analiza los conceptos y aspectos metodológicos que son claves en el desarrollo de la ECRM, facilitando la comprensión de los trabajos publicados sobre ECRM que se presentan en el bloque de Resultados (Capítulos 3 y 4). A continuación, se destaca el tratamiento de los datos en el contexto de la ECRM y se describe el conjunto de distribuciones de probabilidad de uso más extendido (Capítulo 5). Los métodos de análisis de sensibilidad son revisados en el Capítulo 6, y finalmente, se proporciona una breve descripción y aspectos clave de la última etapa del Análisis de Riesgos, la **Comunicación del Riesgo (CR)**.

Dentro del bloque de Resultados, el Capítulo 1 realiza una exhaustiva revisión sobre la contaminación cruzada en alimentos, presentando los métodos experimentales para su estudio, identificando los factores que influyen sobre la contaminación cruzada, y finalmente, proporcionando una revisión crítica de los modelos matemáticos de contaminación cruzada actualmente disponibles en la literatura científica.

A partir de estos conocimientos, en el Capítulo 2 se lleva a cabo una aproximación práctica a los fenómenos de contaminación cruzada a través del estudio cuantitativo de la transferencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 durante el proceso de loncheado de un producto cárnico cocido. Con los datos obtenidos, se elaboran dos tipos de modelos matemáticos que describen la transferencia de ambos microorganismos patógenos durante el loncheado, con el objeto de su inclusión en estudios de ECRM.

En el Capítulo 3 se procede a la realización de una **Evaluación de Exposición (EE)** dentro de un esquema de ECRM, la cual se divide en dos etapas diferenciadas. En primer lugar, se lleva a cabo una aplicación práctica de los modelos de contaminación cruzada mediante el empleo de escenarios. Se describen 9 escenarios de manipulación de productos cárnicos cocidos, considerando el uso de guantes y el lavado de manos como barreras de prevención frente a la contaminación cruzada por *L. monocytogenes*. En una segunda etapa, el crecimiento de *L. monocytogenes* en ambiente doméstico se cuantifica mediante la utilización de distintos “modelos predictivos” de crecimiento. Finalmente, se emplea el concepto Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO) como criterio para establecer un ranking de riesgo de los escenarios estudiados. Este ranking puede servir como base en los procesos de toma de decisiones dentro de un esquema de GR.

En el Capítulo 4 se realiza una ECRM para *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos, donde se presentan diferentes herramientas metodológicas y se aborda el uso del análisis de sensibilidad como medio para profundizar en los factores de relevancia en el riesgo de listeriosis. Con objeto de profundizar en las estimaciones del riesgo microbiano, en este estudio se incluye un análisis de Monte-Carlo de dos dimensiones de modo que se puedan distinguir las componentes de variabilidad e incertidumbre de los datos. Con este trabajo se pretenden definir las estrategias conducentes a la mitigación del riesgo a través de la eliminación de

raciones con determinados rangos de concentración del patógeno, así como un adecuado control de la temperatura y tiempo en ambientes domésticos.

Finalmente, se incluye un bloque de Discusión General acerca de los resultados obtenidos de acuerdo con el *Artículo 33 del Título V de la Normas Regulatoras de los Estudios de Doctorado de la Universidad de Córdoba*, relativa a la preparación, presentación, lectura y nombramiento de los tribunales de Tesis doctoral. La discusión incide en aquellos aspectos de relevancia surgidos de los distintos artículos de Resultados, si bien, dos aspectos son tratados con especial detalle, los factores de riesgo y el control de listeriosis así como la contaminación cruzada y su inclusión en la ECRM.

La presente Tesis doctoral constituye una primera aproximación y un primer avance en el desarrollo y estudio de la ECRM, siendo su aplicación en España aún incipiente. Los resultados obtenidos como consecuencia del propósito exploratorio de la presente Tesis doctoral no sólo son importantes desde un punto de vista metodológico, sino que su consideración, pueden servir de gran ayuda en el estudio y desarrollo de políticas de control de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos.

La contaminación cruzada surge como un interesante aspecto relevante en el riesgo alimentario. Pocos estudios hasta la fecha han profundizado sobre este factor y han abordado el desarrollo y aplicación de modelos matemáticos. Con este trabajo se proporciona una novedosa visión de este tipo de fenómenos, y se perfilan las bases para su inclusión en un esquema de ECRM.

II. BASES CONCEPTUALES Y METODOLÓGICAS

1. Una visión global de la gestión de la seguridad alimentaria

1.1 Primero fue el riesgo, y después los sistemas de gestión

La Real Academia Española de la lengua define la palabra riesgo como “la contingencia o proximidad de un daño”. No obstante, el riesgo más que un término es una percepción, y como tal es variable y amplio en los factores que lo afectan y lo definen.

En nuestro mundo actual, cualquier actividad, por rutinaria que parezca, lleva consigo un riesgo: El hombre en su actividad diaria se enfrenta a multitud de situaciones de riesgo que debe resolver a través de acciones muchas veces realizadas de forma instintiva. Estas son resultado de un proceso de ponderación de opciones y decisiones. Este proceso se basa en la experiencia adquirida propia o ajena. En nuestros días, este mismo proceso puede ser traducido a términos más globales y formales, esto es, la gestión del riesgo, entendido como un esquema racional sobre el que se basan los procesos de toma de decisiones y que tienen como fin último la reducción del riesgo.

La gestión del riesgo en cualquiera de sus facetas ha sido siempre un asunto de gran preocupación para organizaciones internacionales y gobiernos. Problemáticas nacionales tales como la seguridad en la carretera, la amenaza terrorista, la seguridad en el trabajo o bien la seguridad de los alimentos exigen una gestión del riesgo formalizada. Para ello en cada área se han desarrollado las herramientas necesarias y apropiadas.

1.2. Antecedentes de los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria

Si pudiéramos crear un área nueva que tratase las enfermedades transmitidas por los alimentos a lo largo de la historia, podríamos fácilmente estructurarla en etapas atendiendo a cómo se han abordado las políticas de seguridad alimentaria. En un primer periodo, muy atrás en el tiempo, esta se basó en la experiencia adquirida a través de la observación de las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos. Como ejemplo, tenemos el “principio de prohibición” originado en el Imperio Romano, que podría ser considerado como la primera aproximación más o menos formal a lo que ahora llamaríamos legislación alimentaria. Este principio prohibía la producción e ingestión de algunos tipos de alimentos por grupos específicos de la población sobre los cuales había sido comprobado que causaban una alta mortalidad (Notermans y col., 2002).

Ya en el siglo anterior, el mayor conocimiento sobre las toxiinfecciones alimentarias y los agentes causales (bacterias principalmente), junto con la experiencia acumulada a lo largo de siglos de lucha contra estas enfermedades posibilitó la confección de guías de Buenas Prácticas de Elaboración (BPE), Buenas Prácticas Higiénicas (BPH), Criterios Microbiológicos (CM) y a una legislación alimentaria organizada horizontal y verticalmente. Más recientemente se ha

introducido sistemas específicos basados en una gestión del riesgo formal, como los programas APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico), que han hecho partícipe a la empresa alimentaria en la gestión de la seguridad alimentaria. Actualmente, el gran desarrollo mostrado por el método científico y la tendencia a optimizar procesos a través de su sistematización han conducido a la necesidad de uniformar, estandarizar y estructurar la gestión del riesgo. Con ello, no se pretende abandonar el planteamiento que históricamente ha prevalecido, basado en las consultas de expertos y en el empleo de los “valores por defecto” (límites y medidas de control conservadoras que se establecen para garantizar la seguridad de un proceso o de un alimento); sino completar, fundamentar y mejorar su resultado a través de un enfoque estructurado y basado en datos científicos. En este sentido, la World Trade Organization (WTO) (1995) a través de los acuerdos del GATT (“General Agreement on Tariffs and Trade”) y SPS (“Sanitary and Phytosanitary Agreement”) propone que para asegurar un comercio internacional justo y seguro se deben establecer estándares y legislación alimentaria armonizada, basada en un enfoque científico y riguroso, recomendando para ello la aplicación de técnicas de Evaluación del Riesgo (ER).

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) en 1995, tomando el relevo de la WTO introduce, a través de reuniones de expertos, el concepto de Análisis de Riesgos (AR) como un esquema sistematizado y “racional” sobre el que se debe fundamentar el desarrollo de estándares alimentarios a escala nacional e internacional (FAO/WHO, 1995). Este enfoque también podría ser utilizado por industrias y compañías alimentarias, si bien, en este caso su desarrollo está principalmente orientado a mejorar los programas APPCC y a evaluar desde el punto de vista bio-sanitario nuevos diseños y productos (Voysey, 2000; van Gerwen y Gorris, 2004). Recientemente, este enfoque de gestión ha sido completado y desarrollado a través de la inclusión de otros conceptos como el “objetivo de seguridad alimentaria” que explicaremos en posteriores capítulos (ICMSF, 2002)

1.3. Necesidad de un nuevo enfoque de gestión de la seguridad alimentaria

El sector agroalimentario es una de las principales fuentes económicas de la Unión Europea con una producción anual valorada en casi 600.000 millones de euros, es decir, cerca del 15 % de la producción industrial total. Esta industria es el tercer mayor empleador en el sector industrial, y ocupa a más de 2,6 millones de empleados, un 30 % de los cuales trabajan en pequeñas y medianas empresas. Por otro lado, el sector agrícola tiene una producción anual de cerca de 220.000 millones de euros y proporciona el equivalente a 7,5 millones de puestos de trabajo a tiempo completo. Las exportaciones de productos alimenticios y bebidas ascienden a 50.000 millones de euros al año.

Los brotes transmitidos por alimentos, por su elevada incidencia y sus graves consecuencias en algunos grupos de población, suponen un problema de salud pública actual, además de tener importantes repercusiones económicas. Por ejemplo, en España, durante el año 2003, el Sistema de Información Microbiológica (SIM) recopiló datos de más de 1.000 brotes de toxiinfecciones alimentarias (TIAs).

Sin embargo, esta cifra es probablemente más elevada, debido a que, en muchos casos, los enfermos con sintomatología leve no acuden a los servicios atención primaria, y por tanto, el hecho no puede ser registrado.

Más allá de las fronteras nacionales, las enfermedades de transmisión alimentaria también constituyen una preocupación de salud pública. La WHO ha destacado que en países desarrollados hasta un 30 % de la población sufre enfermedades transmitidas por alimentos. En los Estados Unidos, por ejemplo, 76 millones de casos resultan en 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes anualmente (Mead y col, 1999). En países en vías de desarrollo es bien conocido, a pesar de la ausencia de estadísticas fiables, que la incidencia de TIAs es aun mayor; y además, casos que en países desarrollados no supondrían ningún problema para los sistemas de atención primaria, en estos países pueden conducir irremediablemente a la muerte.

La globalización de mercados y la cada vez más compleja cadena alimentaria han posibilitado que los agentes infecciosos puedan difundirse desde el sitio original de elaboración y empaque hasta lugares situados a miles de kilómetros de distancia. Asimismo, los últimos brotes de origen alimentario producidos en Europa han demostrado una aparente debilidad de los sistemas de aseguramiento alimentario basados en el Control Oficial y en la aplicación de guías de BPH, provocando una falta de confianza del consumidor.

A través del libro blanco de seguridad alimentaria, la UE estableció las líneas básicas para el desarrollo de las políticas alimentarias en los próximos años, apoyándose en dos pilares básicos: la aplicación de sistemas de autocontrol (APPCC, Planes Generales de Higiene, etc.) lo cual desplazaría la responsabilidad del control del riesgo hacia la empresa alimentaria, y el establecimiento del AR como un sistema de gestión del riesgo alimentario para gobiernos y organizaciones internacionales en el desarrollo de sus políticas de seguridad alimentaria (FAO/WHO, 1995; European Comission, 1998).

1.3.1. El Análisis de Riesgos

El Análisis de Riesgos según FAO/WHO (1995) se compone de 3 elementos (Figura 1.1): Evaluación del Riesgo (ER), Gestión del Riesgo (GR) y Comunicación del riesgo (CR).

La ER es la evaluación científica de un conocido o potencial efecto adverso contra la salud resultado de la exposición humana a un peligro transmitido por los alimentos. Esta definición también incluye la Evaluación Cuantitativa del Riesgo (ECR) la cual ofrece una expresión numérica del riesgo, además de la expresión cualitativa del riesgo, así como una indicación de la incertidumbre asociada.

La variedad de conocimientos necesarios para conducir correctamente una ER exige la creación de un equipo multidisciplinar (microbiología, epidemiología, medicina, tecnología alimentaria, etc.) que pueda manejar apropiadamente la información científica disponible. Según el CAC (“Codex Alimentarius Commission”)

(1999), la ER es un proceso realizado en cuatro fases (aplicable también a peligros químicos y físicos):

1. *Identificación del Peligro (IP)*. Identificación de agentes biológicos, químicos o físicos capaces de causar un potencial efecto adverso sobre la salud y que pueden estar presente un determinado alimento o grupo de alimentos.

2. *Caracterización del Peligro (CP)*. Evaluación cuantitativa y/o cualitativa de la naturaleza de los efectos adversos de un determinado agente biológico, químico o físico que puede estar presente en alimentos

3. *Evaluación de la Exposición (EE)*. Evaluación cuantitativa y/o cualitativa del grado de ingesta de un peligro biológico químico o físico a través de alimentos o de otras fuentes si son relevantes.

4. *Caracterización del Riesgo (CR)*. La estimación cuantitativa y/o cualitativa, incluyendo la incertidumbre asociada, de un efecto adverso y su severidad en una población dada basado en las fases anteriormente citadas, esto es, Identificación del Peligro, Caracterización del Peligro y Evaluación de Exposición.

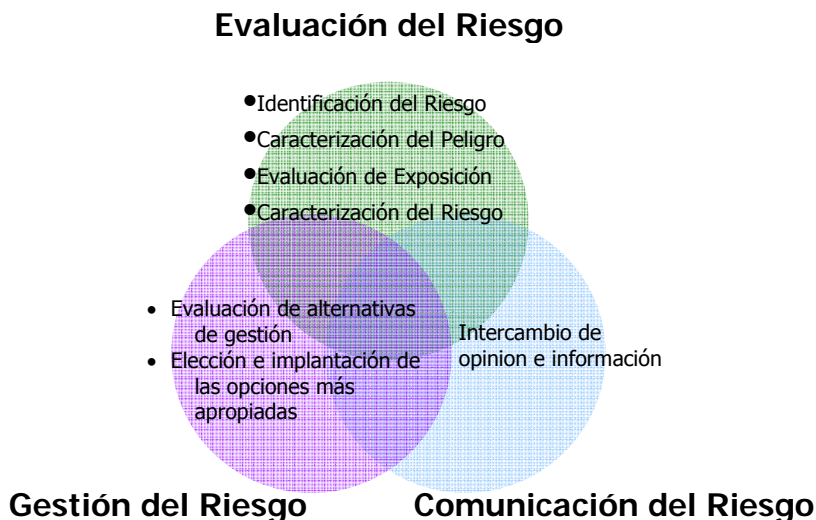


Figura 1.1. Interacción entre los elementos que componen el Análisis de Riesgos

Este proceso y sus resultados son la base para el siguiente paso en el esquema de AR, esto es, la GR. La GR es definida por la propia FAO/WHO (1997) como el "proceso de ponderar las distintas políticas posibles a la luz de los resultados de la evaluación del riesgo y, si procede, elegir y aplicar opciones de control apropiadas, incluidas las medidas reglamentarias". Así, dentro de este esquema, el Codex Alimentarius ha desarrollado su propio procedimiento para elaborar Estándares Codex (FAO/WHO, 2001b).

La última componente del análisis de riesgos es la CR definida como "el intercambio interactivo de información y opiniones sobre el riesgo entre los evaluadores del riesgo, los encargados de la gestión del mismo, los consumidores y otros interesados" (FAO/WHO, 1998).

Estas tres componentes deben estar separadas funcionalmente para evitar cualquier tipo de conflicto de interés. Sin embargo, debe ser considerado, al mismo tiempo, que el análisis de riesgos es un proceso interactivo en donde la interacción entre asesor y gestor del riesgo es esencial en su aplicación práctica (Figura 1.1).

2. Nuevas perspectivas en la gestión de la seguridad microbiológica de los alimentos

2.1. Objetivos de salud pública: “tan bajo como razonablemente alcanzable” (ALARA) y “nivel adecuado de protección” (ALOP)

Tradicionalmente, el nivel aceptable de un peligro microbiano ha venido expresado como el nivel que es “tan bajo como razonablemente alcanzable”, traducción de la expresión en inglés “As Low As Reasonably Achievable” (ALARA) y no en términos de frecuencia y/o concentración.

El ALARA se ha aplicado, durante muchos años, en el sector alimentario para garantizar una producción segura de los alimentos. En un contexto gubernamental, los gestores evalúan el resultado de las opciones de gestión y seleccionan las más adecuadas para alcanzar el ALARA. La base de este planteamiento es que si la industria alimentaria puede mejorar continuamente, el riesgo podrá ser reducido (Todd, 2003). A pesar de que la industria y gobiernos están lo suficientemente familiarizados con este planteamiento como para trabajar de una manera efectiva, se necesita de la absoluta disposición de la industria y de un conjunto de capacidades tecnológicas que en muchos casos no se tienen, de ahí que, “razonablemente alcanzable” puede no ser suficiente para obtener una reducción real en el número de enfermedades. Además, ALARA es un concepto algo ambiguo y que puede diferir entre países o sectores industriales, al igual que ocurre con la capacidad tecnológica (Toyofoku, 2006).

En el acuerdo SPS (WTO, 1995) se afirma que los alimentos pueden ser libremente importados siempre que no se ponga en peligro el “nivel adecuado de protección” sanitaria o fitosanitaria del país, expresión derivada del inglés “Appropriate Level of Protection” (ALOP) y definida en el propio acuerdo como “el nivel adecuado de protección estimado para el miembro (país) estableciendo una medida sanitaria o fitosanitaria para proteger la vida o la salud humana, animal o vegetal dentro de su territorio”. En la misma definición se evidencia que el ALOP está fuertemente influido por aspectos tales como la capacidad del consumidor para controlarlo; de la severidad del peligro; y del nivel de alerta que el peligro suscite sobre los consumidores; en suma, su elección dependerá en gran medida de la percepción del riesgo que se tenga para el peligro y alimento asociado. Este concepto ha sido incorporado, por las organizaciones FAO y ICMSF (“Internacional Commission o Microbiological Specification for Foods”), como la base para el desarrollo de un nuevo esquema global de gestión del riesgo, abandonando así el planteamiento tipo ALARA, que como mencionamos, había suscitado ciertas dudas en cuanto a su efectividad en la reducción de enfermedades de origen alimentario.

En relación a la terminología, la ICMSF (2002) propone la utilización del término “Nivel Tolerable de Riesgo” (NTR), en lugar del ALOP, para ello aluden al hecho de

que “los riesgos asociados al consumo alimentario rara vez se aceptan, sino que más bien se toleran”.

Los documentos de la FAO/WHO (2002 y 2005) desarrollaron más detalladamente el papel del ALOP en un proceso formalizado y global de Gestión del Riesgo Microbiano en alimentos (GRM), y su relación con la Evaluación del Riesgo Microbiano en alimentos (ERM). Según FAO/WHO (2002), un ALOP puede articularse como una afirmación en relación a la incidencia de una enfermedad (por ej., n° de casos/100.000 habitantes/año) asociada a una combinación de un peligro y alimento específicos y a su consumo dentro de un país, y es frecuente enmarcarlo dentro de un contexto de continua mejora en relación a la reducción de la enfermedad.

Un ALOP se puede articular siguiendo dos tipos de enfoques. Estableciendo un objetivo de reducción para una enfermedad (por ej. de 10 casos a 5 casos por 100.000 habitantes/año) asumiendo implícitamente que el objetivo es alcanzable; o bien modificando tal objetivo en función de las capacidades de gestión que se posean. Ambos planteamientos tienen tanto fortalezas como debilidades. Por ejemplo, en el primer caso, se destinan mayores recursos sobre el aspecto de gestión, ofreciendo mayor flexibilidad y fomentando la innovación; aunque como aspecto negativo es más probable que el objetivo sea irrealista, e imposible de ser cubierto. Por otro lado, el segundo enfoque, al estar basado en el estatus tecnológico actual, es más probable que logre alcanzar el ALOP. No obstante, para que esto sea así, la industria debe cumplir con los requerimientos tecnológicos y/o adoptar las mejores prácticas que ayuden a alcanzar el objetivo de salud pública.

El documento de la FAO/WHO (2002) también afirma que, con independencia del enfoque utilizado, los estudios de ERM pueden contribuir, de manera fundamental, en la dilucidación del ALOP y de otros elementos del esquema de gestión de riesgo tales como medidas de control o CMs. El ALOP se puede definir con unos márgenes de seguridad siempre que estos sean efectivos en la reducción del riesgo y además, estén acorde a la incertidumbre derivada de la ERM de índole cuantitativa (Walls y Buchanan, 2005).

Como mencionamos anteriormente, el ALOP se suele expresar como el nivel de incidencia de una enfermedad en la población (por ej. número de casos anuales), sin embargo autores como Havelaar y col. (2000) propusieron el uso de medidas de salud pública integradas. En concreto, ellos se decantaron por el uso del índice “años de vida ajustado por incapacidad” traducción de la expresión en inglés “Disability Adjusted Life Year” (DALY), que actualmente esta siendo considerado por la WHO como base para el establecimiento de objetivos de salud en las Guías para la Calidad del Agua de Bebida (Havelaar y Melse, 2003). Tal propuesta se fundamenta por el hecho de que el ALOP expresado como incidencia no parece ser apropiado para representar enfermedades asociadas a un peligro microbiano de naturaleza múltiple (por. ej. gastroenteritis, síndrome de Guillain-Barré, artritis reactiva y mortalidad causad por *Campylobacter* spp. Termófilo) (Havelaar y col., 2004). Otras decisiones tales como si se deben considerar grupos de poblaciones específicas, por ej., poblaciones de alto riesgo; si el ALOP se refiere a la enfermedad originada desde un producto alimentario específico o de todo el conjunto; o cómo incluiríamos

otras rutas de transmisión, por ej., de persona a persona o agua a persona, etc. deben todavía ser discutidas para una mejor aplicación del ALOP.

2.2. Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO)

Aunque el ALOP es el objetivo, y también la base, para las políticas de salud pública, no es el concepto más adecuado para desarrollar e implantar las medidas de control necesarias a lo largo de toda la cadena alimentaria (Havelaar y col., 2004). Los términos en los que el ALOP se expresa no forman parte del “lenguaje” que la industria y otros operadores de la cadena alimentaria usan y manejan para diseñar y realizar el control de sus productos (Gorris, 2005). Para esto, la ICMSF (1998) propone la creación de un nuevo concepto llamado objetivo de seguridad alimentaria”, traducción de la expresión en inglés “Food Safety Objective” (FSO), cuya función es establecer un puente de unión entre un objetivo de salud pública, como el ALOP, y la Gestión del Riesgo Microbiano (GRM) en la cadena alimentaria. La Figura 2.1 presenta el FSO como nexo de unión entre el control gubernamental sobre la gestión del riesgo y la gestión del riesgo en la cadena alimentaria.

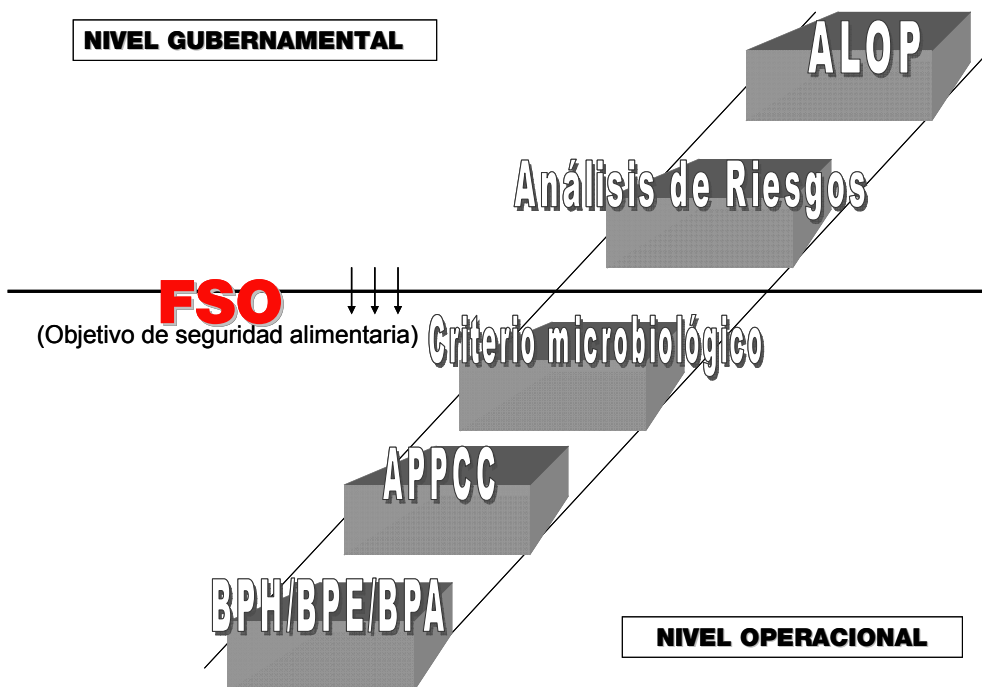


Figura 2.1. Representación de cómo la gestión de la seguridad alimentaria a un nivel gubernamental puede ser enlazada con la gestión de la seguridad alimentaria a un nivel operacional a través de un FSO (objetivo de seguridad alimentaria) basado sobre un ALOP (nivel adecuado de protección) establecido en un marco de Análisis de Riesgos. Buenas Prácticas Higiénicas (BPH), Buenas Prácticas de Elaboración (BPE); Buenas Prácticas Agrarias (BPA). (adaptado de Gorris, 2005)

La ICMSF (2002) define FSO “como la frecuencia y/o concentración máxima de un peligro microbiano en un alimentos en el momento de consumo que proporciona un ALOP”. Esta simple afirmación lleva implícita una valiosa consecuencia: el FSO, como meta, permite una gran flexibilidad a la hora de diseñar e implantar las medidas y/o opciones de control a lo largo de la cadena alimentaria (Zwietering, 2005).

No se debe confundir el FSO con un criterio microbiológico. El FSO se refiere a niveles del peligro en el momento de consumo incluyendo así el efecto de las prácticas de manipulación y preparación a nivel doméstico, lo que implica que no puede ser sometido a comprobación analítica (van Schothorst, 2005); en cambio los CM son usados para comprobar analíticamente la aceptabilidad de un lote, o conjunto de lotes (CAC, 1997).

2.2.1. FSO en un marco de Gestión del Riesgo Microbiano

Siguiendo los pasos de la ICMSF, la FAO ha desarrollado su propio marco de gestión basado en el FSO (FAO/WHO, 2004). Según esta última, el FSO puede ser establecido bien en base a datos epidemiológicos que describen el estatus de salud pública actual en cuanto a un peligro o bien mediante la aplicación de una *curva de caracterización del riesgo*. En este último caso, existe una base cuantitativa para relacionar el FSO y el ALOP, base indiscutiblemente vinculada a una ERM de índole cuantitativa, donde variables tanto de “salida” o “entrada” pueden relacionarse con el FSO y finalmente con un ALOP (ver el apartado *Estimando un FSO a través de la Evaluación del Riesgo Microbiano*). Sin embargo, los documentos no son claros en cuanto a si un FSO debe ser derivado, sin excepción, desde un ALOP, o si en algunos casos, los primeros pueden ser establecidos sin considerar los segundos. En la práctica, parece que un FSO podría ser establecido sin hacer uso de un ALOP. De hecho, criterios microbiológicos y otras medidas de gestión han surgido a lo largo de la historia de la GRM solo fundamentadas en decisiones de paneles de expertos. Lo que si parece claro es que previo a su implantación, tendrá que ser considerado si el FSO es factible o no, o lo que es lo mismo, si la industria y los distintos operadores que forman la cadena alimentaria tienen los recursos necesarios para cumplirlo

En líneas generales, la GRM basada sobre el FSO podría ser estructurada en 4 fases fundamentales, según el estudio de Swarte y Donker (2005):

- Evaluación del Riesgo
- Establecimiento de un ALOP y FSO
- Traduciendo la gestión del riesgo a procesos de gestión
- Interacción entre la Evaluación del Riesgo y Gestión del Riesgo
- Comienzo de un ciclo nuevo o consolidación

2.2.2. Desarrollo matemático del concepto FSO

Su relación directa con la ERM de índole cuantitativa se simplifica con la inecuación propuesta por la ICMSF (1998 y 2002). La inecuación considera de forma

resumida el efecto de los distintos procesos y subprocesos (crecimiento, recontaminación y reducción) para alcanzar un FSO:

$$H_0 + \sum I + \sum R \leq FSO \quad (2.1)$$

H_0 es la población inicial de microorganismos, I es un factor de incremento y R es un factor de reducción. Todos los términos de la inequación son expresados en \log_{10}

2.2.3. Estimando un FSO a través de la Evaluación del Riesgo Microbiano en alimentos

Como mencionamos anteriormente, el FSO y ALOP son conceptos que pueden derivarse de la ERM de índole cuantitativa. Según la ICMSF (2002) un FSO puede ser dilucidado a partir de un ALOP, aplicando lo que ellos denominan un modelo de *caracterización del riesgo* que relaciona el valor de exposición (FSO) con la incidencia de la enfermedad (ALOP). El cálculo se realizaría en un sentido inverso a como se realiza en una ERM, así, el ALOP se toma como variable de “entrada”, en lugar de “salida”, para estimar un FSO, que en este caso será el resultado. La Figura 2.2 ilustra esta explicación con un simple ejemplo, donde establecido un ALOP de 5 casos/100.000 habitantes/año se pretende dilucidar el FSO correspondiente (log ufc/g). Aunque ejemplos similares han sido publicados en la literatura (ICMSF, 2002; Stewart y col., 2003; Stringer, 2005), debemos mencionar que aún se plantean muchas dudas a raíz de este enfoque. Como ocurría para el ALOP el FSO puede tener unos márgenes de seguridad, si bien aun no esta claro cómo podrían ser definidos o si estos realmente no implicarían, contradictoriamente, una reducción de los niveles de seguridad, más que un incremento.

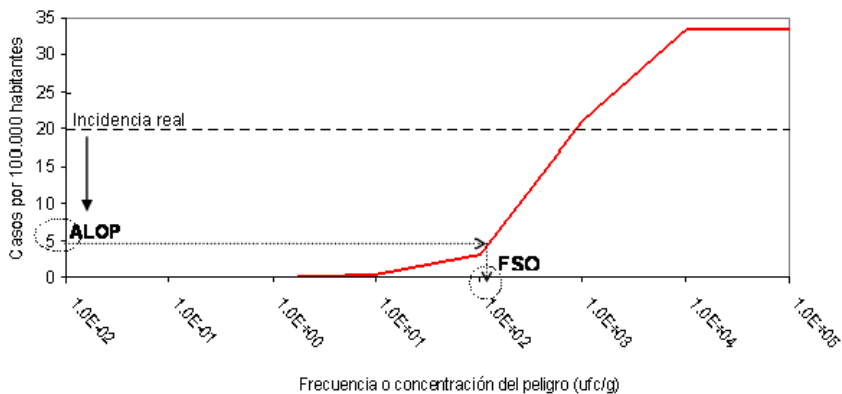


Figura 2.2. Interpolación en la curva de caracterización del riesgo

El modo de aplicación de la *curva de caracterización del riesgo* no está totalmente clarificado, según propone la ICMSF (2002), ya que no se especifica como un modelo D-R (modelo Dosis-Respuesta) podría ser usado para estimar un valor de FSO a partir de un valor de incidencia de la enfermedad en la población. Debemos tener en cuenta que un modelo D-R trata sobre riesgo individual (probabilidad individual de enfermar) y no poblacional (por ej., número de casos/100.000 habitantes). Por ello, pensamos que la ICMSF debería ser más precisa, y definir qué tipo de modelos deben ser usados para realizar el mencionado cálculo. Por último, es interesante señalar que el uso de unidades logarítmicas en la inecuación puede conducir a estimaciones erróneas cuando se aplican a procesos de recontaminación o contaminación cruzada ya que estos sólo pueden ser entendidos como procesos aditivos, y no logarítmicos (Havelaar y col., 2004; McMaster y Todd, 2004).

2.3. Integración del FSO en la cadena alimentaria

El FSO puede ser entendido como el eje de un sistema más o menos complejo de objetivos que industriales y otros operadores a lo largo de la cadena alimentaria pueden usar como criterio para seleccionar y desarrollar las *medidas de control* necesarias (Figura 2.3).

La principal fortaleza del nuevo marco de GRM radica en su estructura basada en un sistema de objetivos “cuantificables”, que, primeramente la ICMSF (2002), y posteriormente, la FAO/WHO (2004) han intentado delimitar y definir a través de distintos conceptos. Los dos primeros serán definidos aquí según propone FAO/WHO (2004):

Objetivo de Rendimiento (OR): “la máxima frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento, en un fase específica de la cadena alimentaria antes del momento de consumo, que proporcione o contribuya al logro de un FSO o un ALOP, según corresponda”.

Criterio de Rendimiento (CR): “el efecto que debe ser logrado en la frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento por medio de la aplicación de una o más medidas de control para lograr o contribuir a lograr un OR o un FSO.”

Estos términos y conceptos deben ser nuevamente traducidos a otros aún más cercanos a industriales, estos son, los **criterios de proceso** y **criterios de producto**. van Schothorst (2002) define los criterios de proceso como los parámetros de control (por ej. tiempo, temperatura, pH, actividad de agua, etc.) en un paso que deben ser aplicados para lograr un criterio de rendimiento. En un contexto de APPCC estos corresponderían con los límites de control de un proceso (Jouve, 1999). Los criterios del producto son definidos como los parámetros en un alimento que son esenciales para asegurar que se alcance un FSO (van Schothorst, 2002 y 2005). Todo este conjunto de objetivos, criterios y límites podrá ser considerados en los programas APPCC y las guías BPE/BPH para así lograr el FSO finalmente (van Schothorst, 2005).

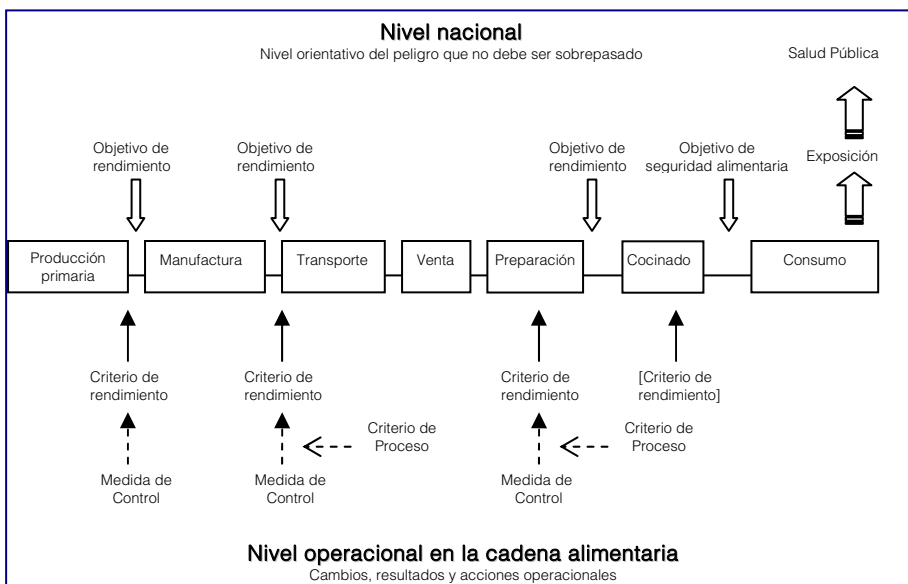


Figura 2.3. Representación esquemática de cómo las directrices gubernamentales son traducidas a medidas en puntos relevantes del nivel operacional a lo largo de una cadena alimentaria imaginaria. Las directrices son proporcionadas en forma de FSO u OR. En un nivel operacional las medidas consisten en BPE/BPH y APPCC (adaptado de Gorris, 2005).

2.4. Criterios Microbiológicos

Los CMs son otro elemento propio del sistema tradicional de GRM que aún tienen cabida en el esquema regido por el FSO. De hecho, los CMs, si se aplican, deben basarse en un FSO previamente establecido. No obstante, y aunque parezca contradictorio, la propia ICMSF (2002) indica que en algunos casos estos pueden ser desarrollados sin necesidad de la existencia de un FSO. En muchos casos, cuando se desconoce si se están aplicando programas de APPCC y/o guías de BPE, pueden usarse los CMs basados en un plan de muestro establecido como un elemento decisorio para aceptar o rechazar un lote de productos. También pueden ayudar a validar si las medidas de control logran los CR (ICMSF, 2002). Por último, relacionados con los CMs, según ICMSF (2002), están los denominados criterios por defecto, que son utilizados cuando no existe un FSO; acordados en un panel de expertos, son establecidos para tratar de controlar peligros en las peores condiciones, y por ello, serán menos flexibles.

Los CMs han sido el pilar sobre el cual se han sustentado las políticas legislativas alimentarias. Mediante su aplicación se puede determinar si un producto es aceptable en base a la ausencia/presencia o concentración del microorganismo por unidad de masa, volumen, área, o lote de alimentos (FAO/WHO, 2001a; Todd, 2003). Un CM debe hacer referencia a un microorganismo de interés y afirmar claramente el motivo de su consideración; además, debe incluir la lista de método(s) para la detección o cuantificación del microorganismo, indicar el número de muestras, el método de muestreo, y el tamaño de la unidad analítica; identificar los

límites microbiológicos apropiados en cada punto especificado en la cadena alimentaria, y el número de unidades analíticas que lo conforman (FAO/WHO, 2001a).

En un ámbito más general, según la ICMSF (2002), los CMs pueden ser establecidos por tres diferentes motivos:

Utilidad económica: Flora alterante, tiempo de vida media, contaminación general

Indicador: Verificación de los programas APPCC y BPE; *Staphylococcus aureus*, indicador de contacto a través de manipuladores; *Escherichia coli* y coliformes señalan contaminación fecal y recontaminación, respectivamente; y por último, *Listeria innocua* indica posible presencia de *Listeria monocytogenes*.

Patógenos: son usados como estándares de conformidad, investigación de brotes, verificación de los programas APPCC y BPE.

A pesar de las diferencias entre FSO y CM, previamente señaladas, existen ciertos elementos en común entre ambos, y que también se relacionan con el OR:

- La evidencia de un peligro para la salud real o potencial
- Condición microbiológica de materias primas
- Efecto del procesado
- La probabilidad y consecuencia de contaminación y crecimiento durante manipulación, almacenamiento y uso
- Consumidores de riesgo
- Tasa coste/beneficio de la aplicación
- Uso destinado para el producto

A diferencia del FSO, el OR (referido a fases anteriores al consumo) puede ser confirmado a través de análisis microbiológicos. Sin embargo, dado que el FSO y OR están relacionados, también lo estarán el FSO y CM, aunque de manera indirecta. Con esto queremos decir que a pesar de las diferencias existentes entre ambos conceptos, un CM podría estimarse, cuando sea necesario, a partir de un FSO establecido. Aún así, todavía existen ciertas dudas sobre la relación matemática entre ambos conceptos, ya que un CM es un concepto práctico, que viene acompañado de un conjunto de parámetros metodológicos y analíticos, y el FSO, un concepto teórico. Whiting y col. (2006) ha sido el primer estudio en presentar una aplicación práctica a este respecto. El estudio concluye que el análisis de la sensibilidad del CM se hace crucial en el proceso de elección del número de muestras (n); además, destaca que el hecho de no considerar la importancia del límite de detección del método microbiológico en el establecimiento del límite microbiológico (m) es una de las debilidades de los planes actuales de muestreo. Sin embargo, aún encontramos puntos sin clarificar, tales como la elección del porcentaje de muestras que pueden superar el FSO, o su aplicación en un sistema de tres clases. La base metodológica aplicada en este estudio se encuentra recogida en gran parte en los capítulos 7 y 8 del libro *Microorganismos de los Alimentos 7* (ICMSF, 2002). Para mayor detalle sobre la base estadística, pueden ser consultados los estudios de Legan y col. (2001) y Dahms (2001). Este último también trata el concepto FSO, aunque muy someramente. En el primero de estos estudios se ha

diseñado una macro de Excel que puede servir como herramienta en el desarrollo de planes de atributos de dos y tres clases <http://www.icmsf.iit.edu/sampleplans1_02.xls>. Dos premisas son claves en el desarrollo de planes de muestreo: primero asumir normalidad en la distribución del microorganismo en un lote, y segundo, partir de una distribución conocida para el lote.

FSO y OR pueden ser observables en tanto y cuanto su expresión y definición lo permita. Un ejemplo de la relación existente entre FSO/OR/CM, se expone a continuación. Supongamos que establecemos un FSO para *Listeria monocytogenes* en 100 ufc/g. Como ya mencionamos este valor no puede ser confirmado empíricamente dada la imposibilidad de realizar la medición en el momento de consumo. Sin embargo, si el nivel de un patógeno no cambia a lo largo de las fases que transcurren hasta el momento de consumo (producto microbiológicamente estable), se podría medir un CM establecido en la fase de fabricación estando directamente relacionado con el FSO. En cambio, para productos no estables, los valores del microorganismo en fases intermedias del proceso podrían cambiar durante su camino hasta el consumidor. Estos cambios son dependientes de una gran variedad de factores, (temperatura y tiempo de almacenamiento, manipulación no higiénica, etc.) que hacen su estimación también variable. En estos casos se debe tener en cuenta el posible incremento. Por ejemplo, si se supone un aumento de 100 veces la cantidad original desde la fase de fabricación hasta el consumo, deberíamos establecer un OR (en industria) de al menos ausencia en un gramo. Reduciendo el OR se puede incrementar la seguridad de que el FSO no se sobrepasa, sin embargo, su aplicación a través de un CM depende mucho de las limitaciones metodológicas y analíticas.

La aparición de nuevas técnicas microbiológicas, rápidas, eficaces y fiables (PCR, técnica ELISA, biosensores, etc.) podrían posibilitar reducir los límites de detección para los CMs (Todd, 2003). Aún así, límites muy bajos como 1ufc/10kg sólo pueden ser abordados a través del uso de microorganismos indicadores, estableciendo CMs para estos, de modo que se cumplan los OR y CR establecidos para el patógeno. Aquí también existen limitaciones, ya que no todos los patógenos pueden ser bien relacionados con grupos de microorganismos indicadores, o incluso, cuando es posible, puede no haber métodos de cuantificación apropiados. En tales casos, la ICMSF (2002) ha establecido un procedimiento que usa la Evaluación del Riesgo semi-cuantitativa y el desarrollo de "Casos".

2.5. ALOP/FSO en el marco internacional

Las diferencias existentes entre países (culturales, organizativas, industriales, etc.) en un mercado cada vez más globalizado implica que la importación/exportación de alimentos pueda estar sujeta a diferentes criterios de seguridad alimentaria, con el consiguiente impacto sobre los niveles de riesgo en los países implicados. Estas diferencias a veces han conducido a importantes conflictos comerciales y políticos. En este sentido, el esquema de gestión de riesgo basado en el ALOP/FSO (ICMSF, 1998 y 2002), por su claridad y sistematización, se propone

como un marco donde comparar y minimizar las posibles diferencias entre países en aspectos tales como:

- Equivalencias entre distintos sistemas de gestión nacional
- Aranceles técnicos entre países
- Niveles de Protección

Es clave para el comercio internacional el aspecto relacionado con las equivalencias. El concepto de equivalencia fue introducido en los acuerdos del GATT y SPS, y hace referencia al hecho de que las medidas de control establecidas entre países que comercian sean equivalentes en cuanto el nivel de protección de los consumidores (WTO, 1995). Es decir, dos países podrán establecer relaciones comerciales cuando posean un nivel similar de protección, independientemente del marco legislativo y del control que desarrolle cada uno. Lógicamente, tal demostración recae en el país exportador, el cual debe decidir sobre si son o no equivalentes en función de las pruebas aportadas por el exportador (incluyendo auditorías y otros mecanismos adicionales). Sin embargo existen limitaciones serias en cuanto a cómo los primeros pueden comprobar la seguridad de los productos importados, sin conocimiento de aspectos propios del país exportador tales como legislación, medidas de control, sistemas organizativos, etc.

Como ya mencionamos, en este ámbito de comprobación tiene una especial relevancia el esquema basado en el ALOP/FSO (van Schothorst, 1998). Así, si se demuestra que el ALOP (o FSO) establecido por el importador puede ser alcanzado a través de las medidas sanitarias establecidas por el exportador, la equivalencia quedaría también demostrada.

Actualmente, este aspecto ha motivado la realización por parte de CAC de una guía para la determinación de la equivalencia de medidas sanitarias, donde se propondrá un marco para desarrollar procesos de evaluación de equivalencias (CAC, 2003). De este se puede extraer que las medidas sanitarias pueden ser específicas y con un objetivo concreto, mientras que el ALOP es más flexible. Se puede expresar de manera específica (por ej. número de casos de una enfermedad al año en una población determinada) o mucho menos específica (por ej. objetivos amplios relacionados con la seguridad alimentaria). Independientemente de cómo se exprese el ALOP, se debe establecer una base objetiva para comparar las medidas sanitarias, incluyendo los siguientes aspectos:

- Motivo de la medida sanitaria
- La relación con el ALOP en forma cuantitativa cuando sea posible
- Cuando se disponga de información sobre la determinación del riesgo: la expresión del riesgo
- El nivel de un peligro en un alimento que es tolerable respecto al ALOP (FSO).

2.6. Etapas de la Gestión del Riesgo Microbiano

El esquema de GRM ha sido desarrollado por la FAO a través de una serie de documentos, entre los que destacamos dos consultas de expertos que tuvieron lugar en Kiel, Alemania (FAO/WHO, 2000 y 2002) y, más recientemente, la elaboración de "Principios y guías para conducir la Gestión del Riesgo Microbiano" (FAO/WHO, 2005a). Paralelamente, ICMSF (2002) ha explorado la conveniencia de establecer un sistema de gestión del riesgo basado en objetivos, cuyo mayor peso conceptual recae sobre el FSO. Los pasos básicos en un esquema de GRM según FAO/WHO (2005^a) se resumen en la Figura 2.4.

Como ya mencionamos, cuando tratamos específicamente con la ERM, un problema de seguridad alimentaria puede surgir cuando se sabe o se cree que uno o más peligros microbianos transmitidos por los alimentos están asociados a uno o varios alimentos. En este caso, un gestor del riesgo se encargaría de su estudio. Al inicio de este proceso, la cuestión debería ser claramente identificada y comunicada desde los gestores de riesgos a los evaluadores de riesgos, así como también a los consumidores afectados y a la industria.

Identificación del problema de seguridad alimentaria

En la identificación de un problema de seguridad alimentaria es crucial estudiar toda la información disponible tal como estudios epidemiológicos o clínicos, datos de prevalencia y concentración microbiana, datos de los sistema de vigilancia epidemiológica, avances tecnológicos y científicos, incumplimiento de normativa, recomendación de expertos, contribución pública, etc. La ICMSF (2002) indica que la información se recopila generalmente por un responsable en la gestión del riesgo que presenta un resumen del problema de seguridad alimentaria y su contexto al responsable de la evaluación del riesgo.

En aquellos casos donde el problema de seguridad alimentaria necesite abordarse con urgencia, los gestores estarán forzados a realizar su decisión de manera inmediata sin poder contar con más información adicional. Por otro lado, cuando los conocimientos científicos sean insuficientes, podría ser apropiado aplicar un enfoque preventivo mediante la adopción de decisiones provisionales. En esos casos, el carácter provisional de la decisión debería ser comunicado a todas las partes interesadas articulándose el periodo de tiempo o las circunstancias bajo las cuales se volverá a examinar la decisión provisional (p. ej., nuevo examen después determinar una ERM) cuando la decisión sea comunicada inicialmente.

Perfil del riesgo

Según la FAO/WHO (2002), el **perfil del riesgo** es la descripción de un problema de seguridad alimentaria y de su contexto que presenta, de forma concisa, el estado actual de conocimientos relacionados con un problema de seguridad alimentaria, las posibles opciones de gestión de riesgo microbiano que han sido identificadas hasta la fecha, si las hubiera, y el contexto de la política para la seguridad alimentaria que influirá en las posibles acciones futuras. Los gestores basándose en el perfil del

riesgo deciden sobre si es necesario profundizar en mayor detalle sobre el problema, recomendando una recopilación más exhaustiva de datos y/o la realización de una ERM, o simplemente, decidiendo las medidas o estrategias más adecuadas que serán aplicadas para resolver la cuestión planteada. En algunos casos, es posible que no se requiera ninguna medida adicional. En este sentido, van Gerwen y col. (2000) indicaron que se puede lograr una mayor optimización de los procesos de ERM si estos se plantean de una manera sistematizada y organizada en fases, donde la consecución de cada una de ellas implica un incremento del nivel de detalle y de la complejidad de la evaluación.

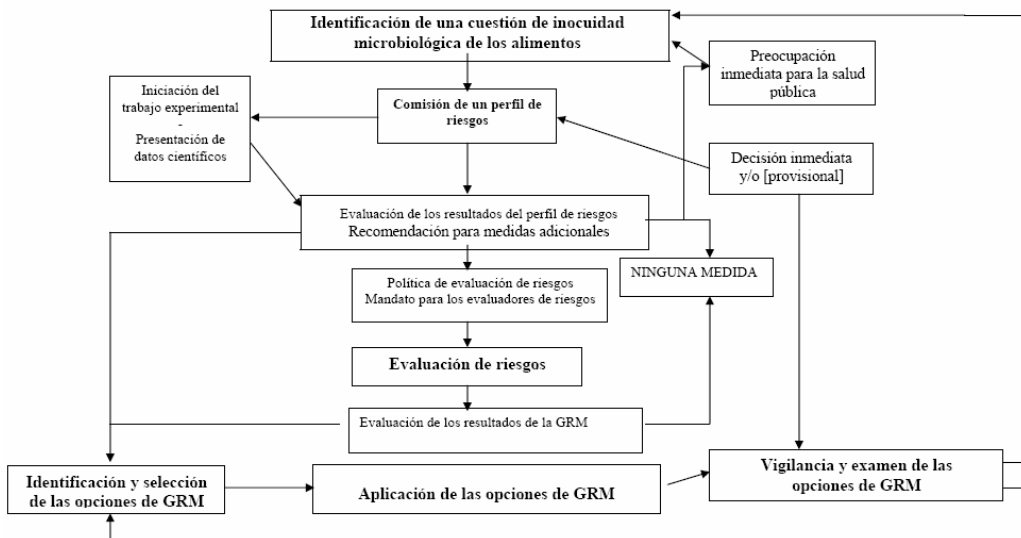


Figura 2.4. Esquema para la Gestión del Riesgo Microbiano (tomado de FAO/WHO, 2005).

Directrices para la ERM

Antes de la realización de una ERM, los gestores deben determinar el propósito y objeto de la ERM (Morgan y Henrion 1990) y establecer las políticas que dirigirán a los asesores durante el desarrollo de la evaluación. Estas políticas pueden versar sobre aspectos generales. Por ejemplo, la FAO, como organización internacional, da un especial énfasis a los países en vías de desarrollo mientras que a nivel nacional, da una especial relevancia a los grupos poblacionales que pudieran requerir un tratamiento específico en la ERM. En cuanto a otros aspectos, también se puede indicar el tipo de análisis de los datos, tratamiento de la incertidumbre, escenarios a modelar, etc.

Evaluación del Riesgo, comunicación de resultados, e interacción entre Gestor y Asesor del Riesgo.

Los gestores del riesgo pueden comisionar la realización de una ERM, en función de la información contenida en el perfil del riesgo. Las directrices y pasos

para la consecución de una ERM, según FAO/WHO, se encuentran en el documento *CAC/GL -30* (CAC, 1999) los cuales serán explicados en próximos apartados, junto a otros aspectos técnicos y metodológicos. Sin embargo, nos gustaría destacar en esta sección que el trabajo de un asesor del riesgo no termina con la estimación del riesgo, sino que una vez obtenidos los resultados, estos deben ser transmitidos de la mejor manera a los gestores. En este sentido, la propia FAO/WHO (2002) recomienda la realización de dos tipos de informes para presentar los resultados: uno detallado, donde se tienen en cuenta todos los aspectos derivados del estudio de ERM, y un segundo informe más resumido, donde se da respuesta a las cuestiones planteadas por los gestores de una manera sencilla y fácilmente interpretable por una audiencia más amplia. También los asesores deben informar convenientemente a los gestores sobre las ventajas y limitaciones de la ERM prestando especial atención a las fuentes de incertidumbre, y sobretodo refiriéndose aquellos aspectos que tienen mayor repercusión en la práctica. Después, los gestores, en función de esta información, decidirán si es propicio usar la ERM para basar y fundamentar las posibles decisiones, políticas, etc. en el esquema de GRM, o si en cambio, aún se necesitara de un estudio más pormenorizado de la ERM.

Evaluación de las opciones de gestión

Esta etapa puede ser considerada como el “corazón” de la GRM y de cualquier otro tipo de esquema de gestión. El gestor decidirá qué opciones de gestión son aceptables y cuales no. En este momento entran en juego una multitud de factores de diversa índole, tales como aspectos sociales, económicos, de percepción del riesgo, avance tecnológico, de coyuntura política, legislativos, etc. Sin embargo, los factores más importantes en los que se debe basar el proceso de selección de las opciones de GRM son la capacidad de mitigar el riesgo, su viabilidad práctica y las consecuencias de las opciones consideradas. Sobre estos aspectos fundamentales tiene especial significación la aplicación de los resultados de la ERM. Basándose en los resultados de varios escenarios en la ERM, describiendo diferentes situaciones de riesgo, y/o medidas de control, y ordenándolas según un ranking de riesgo, el gestor puede decidir más apropiadamente sobre las estrategias más efectivas para implantar en un determinado nivel o proceso en la cadena alimentaria. Existen numerosas opciones de GRM que podrían ser aplicadas con el objetivo de mitigar el riesgo o resolver el problema de seguridad alimentaria. Evidentemente, estas dependerán del tipo de gestor que estemos considerando. Brevemente, enumeraremos, según la FAO/WHO (2005a), las más significativas diferenciando entre organismos internacionales como es la propia FAO y gobiernos de nacionales. En el primer caso, las opciones de GRM pueden incluir:

- La elaboración de normas.
- El suministro de datos que demuestren las relaciones entre las distintas estimaciones de riesgos y los FSO.
- La preparación de un documento guía, incluyendo recomendaciones y prácticas específicas. Cuando haya pruebas que indiquen que existe un riesgo para la salud humana, pero los datos científicos sean insuficientes o incompletos, la Comisión no debería proceder a

elaborar una norma, sino que debería examinar la conveniencia de elaborar un texto afin como, por ej., un código de prácticas, siempre que tal texto estuviera respaldado por las pruebas científicas disponibles.

Por otro lado, para gobiernos:

- Establecer requisitos reglamentarios.
- Elaborar (o fomentar la elaboración) documentos y guías específicas, por ej., las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), BPE, BPH, el sistema de APPCC, [trazabilidad].
- Adaptar las recomendaciones y Guías del Códex a la situación nacional.
- Definir un FSO para una cuestión particular de la seguridad alimentaria, dando flexibilidad a la industria para seleccionar las medidas de control adecuadas para cumplirlo.
- Establecer medidas de control en las que se especifiquen los requisitos correspondientes para las industrias que no disponga de medios para establecer las medidas apropiadas por sí solas o por quienes adoptan tales medidas de control, incluyendo, según corresponda, los OR, CR y CM en fases específicas de la cadena alimentaria, donde la necesidad sea de importancia crítica para el funcionamiento de la cadena en general.
- Establecer requisitos para procedimientos de inspecciones y auditorías, y procedimientos de certificación o aprobación.
- Exigir certificados de importación para determinados productos.
- Fomentar la sensibilización y la elaboración de programas educativos y de capacitación para hacer cumplir o estipular que:
 - La prevención de la contaminación y/o la introducción de peligros se aborden en todas las fases pertinentes de la cadena de alimentos/piensos;
 - Se establezcan procedimientos para la retirada o la recogida rápida de alimentos del mercado incluyendo una correcta trazabilidad del producto.
 - El etiquetado se realice correcto con información que instruya al consumidor respecto a las prácticas higiénicas de manipulación del producto y, cuando corresponda, que informe brevemente al consumidor sobre el problema de seguridad alimentaria.

2.7. Validación y verificación de un sistema de Gestión del Riesgo Microbiano

La validación en este contexto es el proceso que tiene como objeto determinar, usando evidencias, si las medidas de control son efectivas controlando un peligro y que el alimento es seguro. Estos procesos son propios de los planes APPCC. La

validación puede ser previa a su implantación; para ello podemos emplear la “Microbiología Predictiva” (por ej. modelos de crecimiento) y la realización de “challenge tests” (tests de desafío) sobre alimentos inoculados en laboratorio (ICMSF, 2002, Stewart y col., 2003). Si la medida de control no es efectiva, se necesitará implantar medidas correctoras (van Schothorst, 1998). En este contexto operacional (por ej. industrial) los ORs o CMs sirven como guía en el proceso de validación, es decir, se puede estimar que una medida de control es efectiva, si se demuestra que ayuda a lograr o cumplir un OR o CM, respectivamente.

Pero ¿cómo pueden ser validados conceptos de más alto nivel como el FSO? o lo que es lo mismo, ¿cómo se puede verificar un sistema de GRM basado en un FSO? Walls y Buchanan (2005) mencionan que si el FSO se cumple, el objetivo de salud pública representado por un ALOP y relacionado a una reducción del riesgo (de número de enfermos relacionados al microorganismo patógeno) se debería manifestar a través de los sistemas de vigilancia epidemiológica. En algunos casos, puede que tal objetivo no haya sido alcanzado porque los factores considerados en la ERM que sirvieron para establecer el FSO hayan cambiado o no hayan sido considerados. De aquí se deduce que los procesos de verificación deben ser considerados cruciales en los procesos post-implantación de los sistemas nacionales de gestión del riesgo. Solo a través de un sistema de vigilancia epidemiológica bien estructurado, organizado y eficaz en la recogida de datos se puede verificar un sistema de gestión basado en un ALOP. Esto permitiría discernir entre cambios producidos por la implantación del FSO y por fluctuaciones naturales o propias del sistema de recogida de datos.

Finalmente, este enfoque es el camino para poder establecer sistemas de GRM de una manera transparente, basados en la ERM y con sistemas de gestión verificables a ambos niveles, nacional e internacional. Para un mayor detalle sobre este aspecto se recomienda la consulta del documento anteproyecto CX/FH 06/38/8 sobre “Directrices para la validación de medidas de control de la higiene alimentaria” (FAO/WHO, 2006).

3. La Evaluación del Riesgo Microbiano

Tal y como lo define la FAO, la Evaluación del Riesgo (ER) es el resultado de la consecución de 4 etapas, Identificación del Peligro (IP), Caracterización del Peligro (CP), Evaluación de la Exposición (EE) y Caracterización del Riesgo (CR), donde el resultado de cada etapa es el punto de partida de la siguiente etapa (FAO/WHO, 1995). Lamerding y Fazil (2000) definieron la ER para peligros microbianos (ERM), como el proceso que proporciona una estimación de la probabilidad e impacto de un efecto adverso sobre la salud atribuible a alimentos potencialmente contaminados.

Las técnicas de ER han sido desarrolladas durante años por disciplinas tales como la ingeniería de construcción, económica e inversión, toxicología etc. Esta experiencia ha sido tomada como base para un enfoque en seguridad alimentaria. La aplicación en el ámbito de la microbiología alimentaria no ha comenzado hasta hace unos pocos años, necesitando, por ello, un mayor grado de desarrollo. El dinamismo y complejidad de los sistemas biológicos (variabilidad natural, crecimiento, muerte, supervivencia, etc.), objeto de la ERM, añade una dificultad con respecto a otros tipos de ERs (de peligros químicos, ambiental, etc.) donde el objeto de estudio es un sistema inerte, que no sufre modificaciones (Lammerding y Fazil, 2000). Por ello, se deben desarrollar modelos para así simular y/o predecir de la manera más precisa y exacta posible el comportamiento de los microorganismos.

Varias organizaciones y gobiernos han confeccionado guías de ERM. FAO/WHO llevaron a cabo varias consultas de expertos que se plasmaron en un documento final donde se establecen las líneas básicas para la consecución de una ER (CAC, 1999). ILSI (Internacional Life Science Institute) condujo de la misma manera reuniones de trabajo para elaborar un marco general de ERM, dando lugar finalmente a un documento sobre riesgos microbianos en aguas de consumo. Sin embargo el esquema más seguido y difundido es el propuesto por la FAO/WHO, en parte, debido a que este fue desarrollado sobre esquemas de evaluación del riesgo toxicológico y/o ambiental ya ampliamente conocidos y desarrollados

Cuando se plantea la realización de una ERM, es oportuno realizar un análisis previo, antes de la aplicación formal de las cuatro etapas, según la FAO (CAC, 1999). Esta etapa previa ha sido denominada por varios autores (Lindqvist y col., 2002; European Commission, 2003) como perfil del riesgo. En este ámbito, el perfil del riesgo puede ser entendido como una primera respuesta, cualitativa y rápida a las cuestiones y problemas planteados (gestores del riesgo), o cómo un primer paso en el desarrollo formal de una ER, en nuestro caso, microbiano. Esta se basa principalmente en la interacción entre el asesor y gestor del riesgo, con el propósito de establecer claramente el objetivo y objeto de la ERM (Morgan y Henrion, 1990). Además, esta etapa previa puede incluir adicionalmente aspectos relacionados con la caracterización del riesgo y niveles de exposición al peligro.

Una ERM no tiene porqué incluir un análisis completo de toda la cadena alimentaria, si esta no es considerada relevante en el riesgo. Es decir, el objetivo y objeto serán los adecuados para responder específicamente a las cuestiones y problemas planteados. Así, si el peligro y el riesgo solo se localizan en un momento

concreto de la cadena alimentaria, por ej. durante la pasterización de un alimento, las 4 etapas formales de la ERM se restringirían a priori sobre esta única etapa. Incluso, en algunos casos, podemos llegar a una ER sin la necesidad de llevar a cabo todas las 4 etapas que incluyen una ERM formal (CAC, 1999). Por ejemplo, en algunos casos nos puede bastar simplemente con la etapa de EE, donde se determinan los niveles de exposición al microorganismo.

El contexto de aplicación de los resultados es otro factor que debe ser considerado en las etapas previas al desarrollo formal de la ERM. Este es importante a la hora de determinar el modo en el que el riesgo va a ser expresado (enfermos/año, gastos médicos, probabilidad de enfermar/ración, etc.), puesto que así facilitará la interpretación por parte de los gestores del riesgo. Este aspecto será tratado con más detalle en el apartado de Caracterización del Riesgo.

3.1. Identificación del Peligro

El CAC (1999) define peligro "como el agente biológico, químico o físico, o una condición del alimento que pueda provocar un efecto adverso sobre la salud".

La Identificación del Peligro (IP) es la etapa que estudia la existencia de relación entre un peligro (químico o biológico), alimento o grupo de alimentos y un efecto adverso sobre la salud, basado en la recopilación de información desde diferentes campos científicos (epidemiología, medicina, tecnología y microbiología alimentaria, estudios de patrones de consumo, etc.). En muchos casos, no se valora lo suficiente, y no se asignan los recursos necesarios para llevar a cabo una correcta y eficaz identificación del peligro. En nuestra opinión, una exhaustiva etapa de IP debe articularse sobre la realización de una evaluación cualitativa del riesgo por un panel de expertos. Esta puede o no estar basada en el esquema de ER establecido por la FAO/WHO (1995). Aunque sí es cierto que este proceso posee ciertos puntos en común con el APPCC dada su metodología y carácter cualitativo (ICMSF, 2002). A este nivel, la interacción entre el asesor y el gestor se hace fundamental (Lammerding y Fazil, 2000), ya que el gestor debe decidir, a la luz de los resultados del panel de expertos, si el peligro identificado es de relevancia para la salud pública. La existencia de un peligro no implica un problema de salud pública, si no muestra una alta incidencia en la población y/o un efecto grave sobre la salud. Cuando se identifica el peligro en base a esta primera aproximación, el gestor debe decidir si se requiere un mayor análisis, por ej., a modo de una ERM de índole cuantitativa; o si bien, las cuestiones ya han sido respondidas por el panel de expertos.

Para el riesgo microbiano, el propósito de esta etapa es identificar los microorganismos patógenos que puede estar presentes en alimentos (Jouve, 2002). Sin embargo, en los últimos años, las ERMs publicadas no han necesitado a priori la realización de una verdadera etapa de IP puesto que la mayoría de los microorganismos considerados hasta la fecha son reconocidos patógenos de transmisión alimentaria. No obstante, en algunos casos ha sido necesario el estudio de la relación entre patógeno y alimento o grupo de alimentos.

Debido a la facilidad con que se llega a la identificación del peligro, esta etapa se ha visto reducida, prácticamente, a la recopilación de datos sobre las características de patógeno (virulencia, fisiología, transmisibilidad, etc), poblaciones de riesgo y el efecto adverso sobre la salud asociados a su ingestión, datos que serán usados para desarrollar los modelos de EE y CP. Por ejemplo, la información relacionada con los grupos de poblaciones de riesgo y la variabilidad de respuesta al patógeno es de gran utilidad en la confección de los modelos dosis-respuesta y en la elección de escenarios específicos para diferentes grupos de riesgo, todo ello en la etapa de CP.

3.2. Caracterización del Peligro

En la etapa de Caracterización del Peligro (CP) se reúne información sobre la naturaleza de los efectos adversos asociados a la ingestión de un peligro. Según el CAC (1999), esta se desarrolla a continuación de la IP. La necesidad, en la etapa de IP, de recopilar información sobre la relación causa-efecto entre microorganismo y alimento conecta parcialmente con el desarrollo de la etapa de CP. Sin embargo, esta última tiene como objetivo principal el diseño de un modelo dosis-respuesta (D-R). Este tipo de modelos determinan la relación entre la magnitud de la exposición (dosis) a un agente químico, biológico o físico y la gravedad y frecuencia de los efectos nocivos para la salud (respuesta) (ICMSF, 2002). Los modelos de D-R pueden ser de probabilidad de infección o enfermedad, según el tipo de información usada para su construcción.

Esta etapa también aborda el estudio de aquellos factores determinantes en el desarrollo de enfermedad o de un proceso infeccioso. El triángulo epidemiológico (Figura 3.1) es una conocida representación de este aspecto, en donde cada vértice corresponde con un factor clave en el desarrollo de la enfermedad/infección: aspectos sobre el patógeno, hospedador, y matriz alimentaria (WHO/FAO, 2003).

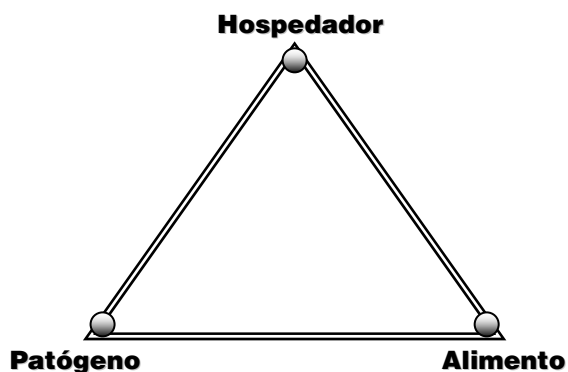


Figura 3.1. *Triángulo epidemiológico*

El desarrollo de los modelos de D-R se sustenta con datos que se obtienen en estudios experimentales con humanos, animales o "in Vitro". Los modelos pueden ser

desarrollados para diferentes grupos de riesgo (niños, ancianos, enfermos inmunodeprimidos, etc.) y completados usando la información recopilada sobre la triada epidemiológica. En este sentido, los paneles de expertos pueden, al mismo tiempo, someter a juicio la fiabilidad del modelo o la necesidad de incluir modificaciones basándose en la información recopilada.

3.3. Evaluación de la Exposición

Además de la definición proporcionada por la FAO/OMS (1995), Lammerding y Fazil (2000) describen la Evaluación de la Exposición (EE) como "la estimación de la probabilidad de que un individuo o población sea expuesto a un peligro microbiano y del número probable de microorganismos que es ingerido". Aunque también, según Haas y col. (1999), EE es "un intento de determinar el tamaño y naturaleza de la población expuesta y la ruta, concentraciones, y distribuciones de microorganismos y la duración de la exposición". Basándonos sobre estas definiciones podemos dilucidar cuales son los elementos necesarios a la hora de desarrollar la EE:

1. Caracterización de la población expuesta: Tamaño de la población objeto de estudio, poblaciones de riesgo (ancianos, niños, embarazadas, personas inmunodeprimidas, etc.), y patrones de consumo.

2. Ruta de transmisión del microorganismo a lo largo de la cadena alimentaria. Para ello, podemos recopilar información sobre los parámetros del proceso (temperatura de esterilización, refrigeración, tiempo de almacenamiento, etc.), concentraciones de microorganismos patógenos e indicadores en las distintas fases de distribución del producto.

3. Determinación de los niveles de exposición en el momento de consumo expresados como valores de prevalencia y concentración que pueden ser distribuciones o valores puntuales dependiendo de si se ha optado por un enfoque "probabilístico" o "determinista".

Los patrones de consumo son parte esencial en el desarrollo de una EE. Por ejemplo, el tamaño de la ración, ratios de consumo anual, semanal, etc., y las circunstancias en las cuales el alimento es fabricado o preparado pueden ser determinantes en los niveles de exposición. Además, consideraciones sobre diferencias regionales, culturales, sociales, etc. deberían ser incluidas, ya que podrían tener asociadas diferentes patrones de consumo. Asimismo, la existencia de grupos o subpoblaciones de riesgo, con diferencias en los patrones de consumo podrían ser claves en la determinación del riesgo.

La aplicación de modelos es necesaria debido a la imposibilidad en la práctica de determinar los valores de prevalencia y concentración en el momento de consumo. También, en algunas situaciones, el resultado de un proceso de crecimiento (almacenamiento) o una fase de inactivación (tratamiento térmico) pueden resultar en cambios de los niveles de prevalencia y concentración que no son detectables experimentalmente dadas las limitaciones de las técnicas de análisis. En estos casos, el empleo y desarrollo de modelos puede además ayudar a cuantificar el efecto de estas sobre los niveles del patógeno. Los modelos actúan

estimando los cambios prevalencia y concentración a lo largo de las distintas fases en la Cadena Alimentaria. Para virus y parásitos, los modelos versan principalmente sobre procesos de descontaminación y/o inactivación, puesto que este tipo de microorganismos no tienen capacidad de crecimiento en el alimento. En cambio, en el caso de las bacterias, dada su capacidad de multiplicación en el alimento, los modelos pueden ser además de crecimiento.

Hay casos en que la EE es conducida usando únicamente los niveles finales de exposición al microorganismo (prevalencia y concentración), sin considerar, por tanto, el efecto de las diferentes fases intermedias que sufre el alimento (por ej. tratamiento térmico, congelación, etc.). Esto limita su aplicación exclusivamente a simples predicciones de riesgo o al establecimiento de un ranking de riesgo. En cambio, los modelos de EE llamados de la “granja a la mesa” incluyen tanto información como modelos de las distintas fases que conforma el objeto de estudio. Esto introduce un mayor grado de detalle en la EE y posibilita que los factores implicados en cada una de las fases o procesos puedan ser estudiados para evaluar su efecto sobre el riesgo final. Para ello, este tipo de EE se basa en un esquema estructurado con modelos, donde se describen de forma compartimentada las distintas etapas y procesos a lo largo de la cadena alimentaria (producción primaria, procesado, punto de venta, ambiente doméstico).

Los datos necesarios para esta etapa pueden ser obtenidos a partir de numerosas fuentes de información:

- Una revisión del aseguramiento de la calidad y datos de proceso
- Datos de muestreo e inspección “in situ”.
- Información sobre diseño de producto y proceso
- Equipamiento e especificaciones de ingredientes
- Registros de la calidad de la materia prima.
- Análisis específicos de productos y materiales en línea o en el producto finalizado.

3.4. Caracterización del Riesgo

Según el CAC (1999), “el riesgo es una función de la probabilidad de que se produzca un efecto adverso para la salud y la gravedad de este efecto, consiguiente a uno o más peligros presentes en los alimentos”.

La etapa de Caracterización del Riesgo (CR) consiste básicamente en utilizar la información de las etapas anteriores para obtener una estimación del riesgo. En otras palabras, los resultados de la EE (concentración y prevalencia) son combinados (extrapolados) con el/los modelo(s) de D-R obtenido(s) en la etapa de CP. Como resultado, se estima el riesgo, que en primera instancia puede ser la probabilidad de enfermar o de infectarse, como consecuencia de la ingestión de una determinada cantidad de microorganismos patógenos presentes en un alimento o grupo de alimentos concreto.

El riesgo puede ser observado desde diferentes perspectivas (unidades de expresión del riesgo). Los valores de probabilidad de enfermar, pueden ser transformados para estimar el número de enfermos anuales o el número de asistencias medicas, llegándose incluso a estimar el coste económico asociado. Es importante destacar que se facilita una mejor interpretación de los resultados por parte de los gestores del riesgo cuando en la elección de las unidades de expresión del riesgo se tiene en cuenta el contexto de aplicación. Por ejemplo, en un contexto de salud pública, el riesgo es poblacional, y no individual; por tanto, se deberá expresar como el número de casos/año en lugar de como la probabilidad individual de enfermar.

También es de importancia la dimensión económica en el riesgo. Países desarrollados como los Estados Unidos tienen un elevado gasto económico-sanitario como consecuencia de las TIAs. En el año 2000, el ERC (“Economic Research Service”) (ERC, 2000) perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) estimó el gasto asociado a 5 bacterias patógenas en 6.900 millones de dólares (Tabla 3.1). El aspecto económico del riesgo es considerado a la hora de priorizar los riesgos; en la confección de las estrategias de reducción del riesgo, las cuales deben mantener un equilibrio entre coste y beneficio; o en el desarrollo general de las políticas de seguridad alimentaria.

Tabla 3.1. Costes anuales en los Estados Unidos derivados de las TIAs provocadas por los patógenos seleccionados

Patógenos	Número estimado de TIAs anuales *			Costes 2×10^{12} dólares
	Casos	Hospitalizaciones Número	Muertes	
<i>Campylobacter</i> spp	1.963.141	10.539	99	1,2
<i>Salmonella</i>	1.341.873	15.608	553	2,4
<i>E. coli</i> O157	62.458	1.843	52	0,7
<i>E. coli</i> , no O157 STEC	31.229	921	26	0,3
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.493	2.298	499	2,3
Total	3.401.194	31.209	1.229	6,9

* Datos obtenidos por el Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos.

4. Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano

La ERM se fundamenta en la aplicación de modelos, esencialmente en las etapas de Evaluación de la Exposición (EE) y Caracterización del Peligro (CP) (Lammerding y Paoli, 1997).

Un modelo es una abstracción de la realidad que captura la esencia funcional del sistema, con un nivel de detalle suficiente como para que pueda utilizarse en la investigación y la experimentación en lugar del sistema real, con un menor riesgo, tiempo y coste. Básicamente, un modelo está formado por un conjunto de variables de entrada (“Inputs”) y salida (“Outputs”) y un conjunto de relaciones entre estas variables (Figura 4.1). El output sería el resultado del modelo, que en el contexto de la ERM es la estimación del riesgo y su impacto.

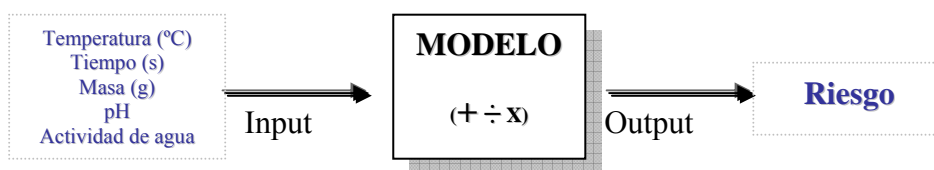


Figura 4.1. Representación esquemática de las componentes de un modelo

Los modelos pueden clasificarse en: modelos físicos, matemáticos y computacionales. El primer tipo se refiere a modelos que se desarrollan en laboratorio, también llamados modelos experimentales. Existen claros ejemplos de este tipo de modelos en la literatura científica: aproximaciones experimentales a la ERM, y más en concreto a la EE. Por ejemplo, el estudio de Kennedy y col. (2005) investigó la presencia de *Staphylococcus aureus* y otros microorganismos patógenos en refrigeradores domésticos registrando el perfil de temperatura para después aplicarlo en el estudio del crecimiento de *S. aureus*, en laboratorio. Este trabajo es un ejemplo de un modelo de EE realizado en laboratorio donde se obtiene como resultado final el número de células de *S. aureus* que se alcanzaría en el alimento en el momento de consumo tras su refrigeración doméstica. A pesar de que estos tipos de modelos son frecuentes en la literatura (Gill y col., 2002), la elevada cantidad de recursos (tiempo, materiales y humanos) que requieren para su realización hace que sólo puedan tratar escenarios muy concretos. Es decir, los modelos experimentales difícilmente abarcarían una EE completa que modele la transmisión del microorganismo a lo largo de todas las etapas en la cadena alimentaria.

Los modelos matemáticos emplean leyes físicas y químicas para describir, en términos matemáticos, el comportamiento de un sistema real (Dym, 2004). Muy relacionados con estos modelos se encuentran los modelos computacionales que se aplican como herramienta de cálculo en la resolución de los matemáticos. Su aplicación conjunta lleva a un ahorro considerable de tiempo, recursos humanos y materiales, en comparación con los modelos experimentales. Además, los modelos matemáticos permiten evaluar mucho más fácilmente el efecto de posibles

modificaciones en el sistema. Este procedimiento es esencial para conocer en detalle el funcionamiento del sistema objeto de estudio. En nuestro caso, esto podría ser comparado al hecho de conocer la influencia de ciertos factores sobre el riesgo final. Las técnicas estadísticas destinadas a este tipo de análisis se denominan análisis de sensibilidad y serán explicadas en detalle en un posterior apartado.

4.1. Modelos de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano en alimentos (ECRM)

Los modelos de ERM pueden ser cualitativos y/o cuantitativos. En el enfoque cualitativo, las distintas etapas son conducidas usando información categórica y no numérica para las variables; en este caso, el resultado (output) de la ERM no es un número sino una clasificación del riesgo (por ej., riesgo alto y riesgo bajo). Por el contrario, la ERM de índole cuantitativa (ECRM) asigna valores numéricos a las variables, dando una mayor precisión en la evaluación; aunque, a cambio requiere mayor y mejor información.

La elección entre los dos tipos, cuantitativo o cualitativo, viene determinada por el número de recursos disponibles y por el nivel de exactitud y precisión que se desea lograr (Lammerding y Fazil, 2000). Así, cuando la información disponible es reducida o el tiempo para su realización es limitado, un enfoque cualitativo es el más apropiado. Además, la ERM cualitativa se emplea como un paso previo a la ECRM, ayudando a los evaluadores a focalizarse sobre la información realmente necesaria y a establecer el alcance y objetivos de la ECRM que son de interés para los gestores del riesgo.

La ECRM puede ser a su vez, “determinista” o “probabilística” (FAO/WHO, 1995; CAC, 1999). Un modelo de ECRM es “determinista” cuando las variables son definidas por valores numéricos puntuales. La media aritmética es el valor puntual más frecuente, aunque podrían ser usados otros estadísticos (percentil, media geométrica, mediana, etc.). El uso de un único valor para las variables del modelo no es la manera más exacta y completa de definir el *sistema físico* que va a ser modelado. La explicación radica en que el sistema *físico* contiene una variabilidad intrínseca (natural) asociada a la heterogeneidad del sistema (diferentes poblaciones microbianas, diferentes temperaturas de almacenamiento, etc.), y una variabilidad extrínseca, como consecuencia de las limitaciones del observador, también denominada variabilidad experimental o incertidumbre (error de medición, error de muestreo, etc.). Estos dos elementos son eliminados cuando se utiliza un valor puntual como la media aritmética. La importancia de este hecho se ilustra visualmente en la Figura 4.2, donde el uso de un valor puntual (media aritmética) de concentración (log ufc/g) lleva claramente a una pérdida de información (Lammerding y Fazil, 2000): por ejemplo, los valores extremos de la concentración tan determinantes en el riesgo microbiano (Zwietering y Pérez-Rodríguez, 2006) quedan fuera de consideración cuando usamos la media.

El enfoque “probabilístico”, a través del uso de distribuciones de probabilidad que describen la probabilidad asociada a cada valor (o evento), posibilita que la

ECRM (Vose, 2000a) pueda reflejar todas las posibles combinaciones entre los valores de las variables del modelo.

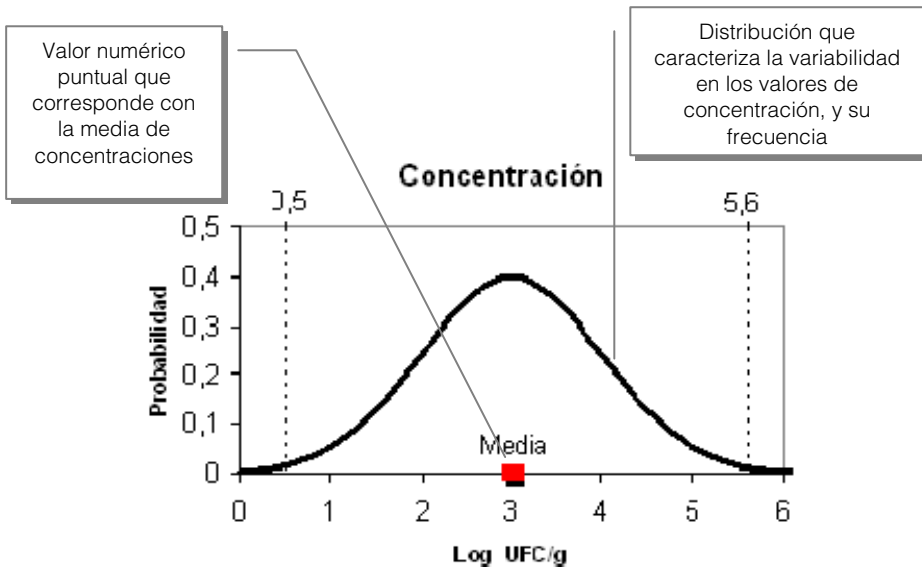


Figura 4.2. Comparación entre el uso de un valor puntual (media) y de una distribución para representar un conjunto de concentraciones (adaptado de Lammerding y Fazil, 2000).

4.2. Utilización de distribuciones de probabilidad en la ECRM

Para realizar cálculos con distribuciones de probabilidad en una ECRM de tipo “probabilístico” se deben emplear técnicas estadísticas específicas como el método de momentos, el método analítico o el método numérico.

El primero hace referencia a un conjunto de leyes de probabilidad que permiten, la adición, substracción y multiplicación de la media y la varianza de una distribución Normal. Sin embargo, este método posee ciertas limitaciones que impiden un uso extendido: la imposibilidad de representar otras operaciones matemáticas (división, potencia, etc.); y la condición de que todas las variables sigan una distribución Normal, lo cual no se cumple en la mayoría de los casos.

Los métodos analíticos se basan en el cálculo simbólico del área de las funciones de probabilidad (distribuciones de probabilidad). Los resultados obtenidos a través de este tipo de cálculo muestran una gran exactitud. Su desventaja radica en que para ciertas funciones de probabilidad o combinaciones de ellas no existe solución a la integración.

Por último, el método numérico, más extendido, hace referencia, principalmente, a las técnicas de simulación de Monte-Carlo y al método de muestreo "Latin Hypercube". El primer tipo consiste en muestrear aleatoriamente cada distribución de

probabilidad en el modelo, produciendo cientos o miles de valores de cada distribución, los cuales se usan individualmente para operar de una manera tradicional. A cada valor o evento muestreado por la simulación se le suele denominar iteración. El muestreo se realiza de tal modo que, al final, el grupo de datos obtenidos reproducen la forma de la distribución original. La Figura 4.3 explica pictóricamente el proceso de simulación de un modelo "probabilístico". A mayor número de iteraciones, mayor precisión en la estimación del área; en otras palabras, un incremento en el número de iteraciones supone una mayor probabilidad de cubrir (muestrear) toda el área de la distribución. Simplificando, podríamos decir que las técnicas de simulación de Monte-Carlo son algoritmos matemáticos que intentan imitar el muestreo en un sistema real. El método de muestreo "Latin-Hypercube" es una técnica similar a "Monte-Carlo" pero más eficiente, dado que el proceso de muestreo es artificialmente forzado para que todas las zonas de la distribución sean muestreadas con menor número de iteraciones (menor tiempo de simulación). Dada sus características, "Latin-Hypercube" esta especialmente indicado i) para simulaciones que se realizan en entorno PC ("Personal Computer"), donde los recursos de cálculo son más limitados y ii) cuando se tengan interés en muestrear zonas en la distribuciones con muy baja probabilidad.

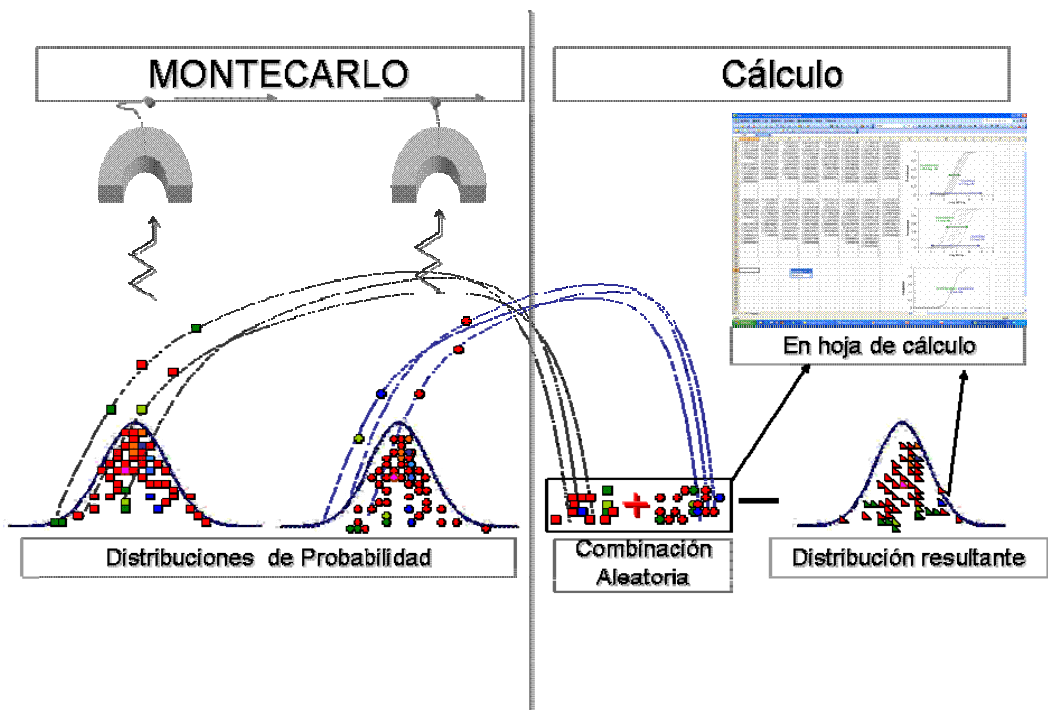


Figura 4.3. Representación pictórica de la simulación de Monte-Carlo. Monte-Carlo actúa como si fuese un "imán" atrayendo y extrayendo los valores de las distribuciones de uno en uno (iteración). Los valores con mayor probabilidad en la distribución serán atraídos más fuertemente, y por tanto serán recogidos con mayor frecuencia. A continuación, todos los valores, acumulados en una hoja de cálculo, son combinados aleatoriamente, según la relación matemática indicada ("+" ; "-" ; "/" ; etc.), para finalmente obtener la distribución resultante ("output").

4.3. Importancia de considerar variabilidad e incertidumbre en la ECRM

Las distribuciones de probabilidad en un modelo “probabilístico” pueden representar incertidumbre y/o variabilidad. Ambos términos se refieren a conceptos totalmente diferentes. Variabilidad representa la heterogeneidad de la población, como consecuencia del sistema físico, e irreducible a través de más medidas o estudio. Variabilidad ha sido descrita como "incertidumbre aleatoria", "variabilidad estocástica", y "variabilidad interindividual. Por otro lado, incertidumbre representa la carencia de conocimientos y puede ser a veces, reducida con más estudios. Esta también se denomina "incertidumbre fundamental", "incertidumbre epistémica", o "grado de creencia".

En relación con estas dos componentes, variabilidad e incertidumbre, los modelos de ECRM pueden ser clasificados en modelos de primer y segundo orden (de una o dos dimensiones, respectivamente). Los modelos de primer orden, o de una dimensión, no establecen una separación entre ambas componentes en las variables, de modo que una sola distribución describe variabilidad e incertidumbre sin distinción. En cambio, un modelo de segundo orden, o de dos dimensiones, aplica más de una distribución para una misma variable. Por ejemplo, en la Figura 4.4, cada distribución individualmente describe la variabilidad, y el conjunto de todas ellas, la incertidumbre.

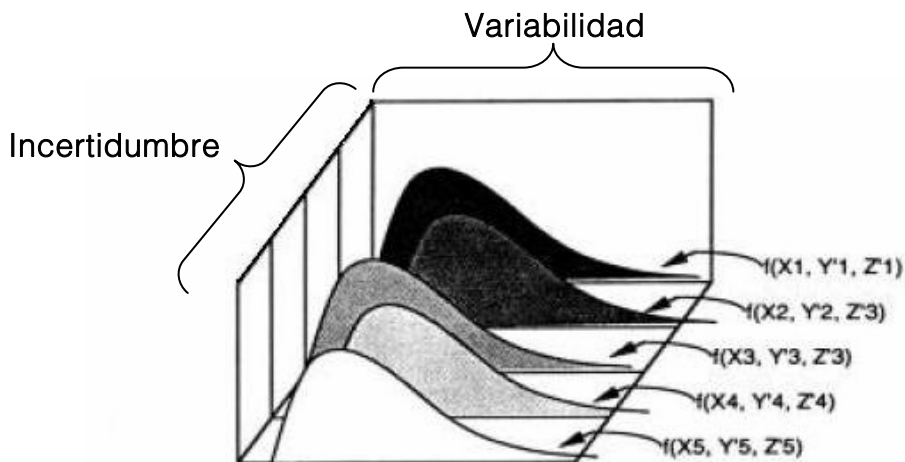


Figura 4.4. Representación de variabilidad e incertidumbre para una hipotética variable (adaptado de Hoffman y Hammonds, 1994)

En la Figura 4.5 A se representa un hipotético “output” que llamamos r . Cada curva acumulativa se corresponde con una posible distribución para el “output”, y su conjunto es la incertidumbre sobre la verdadera distribución de r . Los resultados, en estos casos, pueden ser resumidos numéricamente calculando los intervalos de confianza (90%, 95%, etc.) sobre distintas fracciones a lo largo de la variable r como representa la Figura 4.5 B.

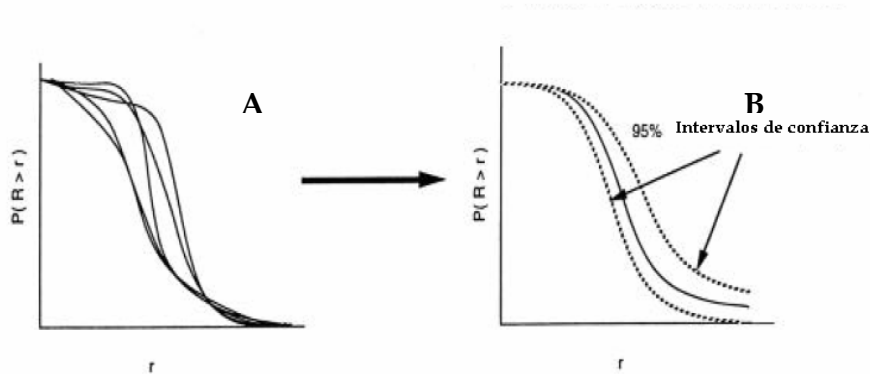


Figura 4.5. Representación de variabilidad e incertidumbre de la variable concentración de un patógeno que llamamos r (adaptado de Hoffman and Hammonds, 1994).

El conocimiento del grado de incertidumbre sobre la estimación ayuda a ponderar las opciones en los procesos de toma de decisión (GR). Para ilustrar esta afirmación usaremos un ejemplo donde se han simplificado los aspectos estadísticos para una mayor comprensión:

Supongamos que la estimación final de una ECRM de primer orden es la concentración de un microorganismo patógeno (log ufc/g) con una media de 3 log ufc/g y una variación de ± 1 log ufc/g. Estos valores significan que la concentración final oscila entre 2 y 4 log ufc/g, siendo el valor más frecuente 3 log ufc/g. Sin embargo, dado que es un modelo de primer orden, desconocemos si esta variación corresponde a la variación real existente entre muestras (variabilidad), o al error del análisis (incertidumbre), o bien, a ambos. Además, en esta última situación también desconoceríamos qué rango se corresponde con cada componente. La Figura 4.6 A representa la distribución de concentraciones obtenida de un modelo de primer orden.

En cambio, para un modelo de segundo orden, el rango de variación ± 1 log se caracteriza o desglosa en una componente de variabilidad y una componente de incertidumbre, como se ilustra en la Figura 4.6 B-C. Así, partiendo del hecho de que la variabilidad no se puede reducir, podríamos encontrarnos con dos tipos de situaciones. Por ejemplo, un posible primer caso sería tener $\pm 0,5$ log de variabilidad y ± 1 log de incertidumbre (ver Figura 4.6 B). Debido al ancho rango de incertidumbre, previo a tomar una decisión, se podría recomendar un mayor estudio y análisis (más información) para reducir esta componente. Pero si se tuviera que tomar una decisión en esta situación, la información sobre las dos componentes todavía es valiosa, puesto que el gestor en estos casos es consciente del grado de fiabilidad de los datos, y en consecuencia, del nivel de consistencia de la decisión que va a tomar. En un segundo caso, opuesto al primero, tendríamos ± 1 log de variabilidad y $\pm 0,5$ log de incertidumbre (ver Figura 4.6 C). La decisión basada en estos resultados sería de una mayor consistencia y fiabilidad que en el caso anterior, puesto que se posee una mayor certeza sobre la estimación.

En ambos tipos de situaciones, la aplicación de técnicas de análisis de sensibilidad puede ser de gran ayuda a la hora de fundamentar y valorar las posibles opciones de gestión. El análisis de sensibilidad ayudaría a identificar aquellas variables (o parámetros) que contribuyen de manera importante a la incertidumbre del modelo. En base a este conocimiento, el gestor puede asignar los recursos necesarios para su estudio de forma más eficiente, reduciendo así la incertidumbre sobre la variable en cuestión, y en consecuencia, sobre las opciones de gestión que se derivan de la ECRM (Cullen y Frey, 1999; Zwietering y van Gerwen, 2000).

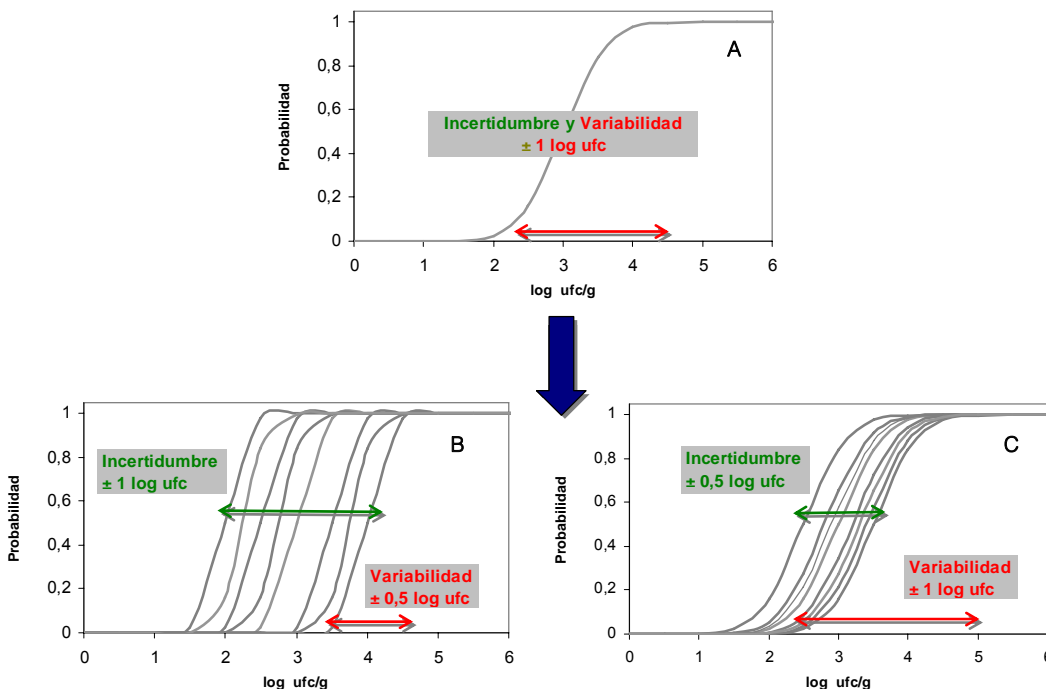


Figura 4.6. Representación gráfica del resultado (“output”) de una hipotética Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM): (A) de primer orden, sin separación entre variabilidad e incertidumbre; y de segundo orden, donde variabilidad e incertidumbre están separadas, (B) con un rango de incertidumbre mayor que de variabilidad; (C) con un rango de variabilidad mayor que de incertidumbre.

Los modelos de segundo orden necesitan un mayor número de recursos (técnicos, calidad y número de datos, tiempo, etc.) en comparación a los de primer orden. Por ello, el asesor y gestor del riesgo deben asegurarse, previamente a su desarrollo, que el problema que se plantea no se puede resolver con un enfoque más simple y menos costoso.

4.4. Avances en el desarrollo de la ECRM

Aunque el esquema propuesto por el CAC (1999) establece las líneas generales para realizar una ECRM, no existen aún procedimientos ni metodologías validadas y publicadas de cómo se puede estructurar y abordar sistemáticamente un ECRM

basada en modelos. Sin embargo, este hecho no ha sido obstáculo para la consecución de ECRMs tanto en el ámbito científico, como en el institucional. Por ejemplo, en el primer caso tenemos ejemplos tan claros como la evaluación cuantitativa sobre *S. aureus* en queso de leche cruda realizada por Lindqvist y col. (2002) basada en la utilización de modelos de crecimiento y D-R para el patógeno. También Bemrah y col. (1998) realizaron una evaluación cuantitativa para *L. monocytogenes* en queso de leche cruda, igualmente basada en modelos de crecimiento y D-R. Ambos están implementados sobre una hoja de cálculo, y simulados con el método Latin-Hypercube.

En el ámbito institucional tenemos que remitirnos a dos organismos de especial relevancia en el desarrollo de este nuevo campo, uno de ámbito nacional, la USDA ("United State Department of Agriculture"); y otro multinacional, la "Food Agriculture Organization" (FAO). La USDA ha publicado varios estudios de ECRM donde el mayor peso de elaboración ha recaído en la "Food Drug Administration" (FDA) y el "Food Safety and Inspection Service" (FSIS) siguiendo una metodología muy estricta en sus etapas: desde consultas iniciales entre asesores y gestores del riesgo para determinar el objeto y objetivo de la ECRM, hasta procedimientos de revisión constante para la mejora del documento original, proceso también importante en una ECRM. Su mejor ejemplo es la ECRM llevada a cabo para *L. monocytogenes* en diferentes alimentos listos para el consumo, que fue especialmente destinada a crear un ranking de riesgo para las diferentes categorías de alimentos (FDA/USDA/CDC, 2003). En este caso, el detalle en los procesos y fases es menos relevante, siendo más importante la estimación del riesgo final que servirá como criterio para establecer el ranking. La implementación del modelo fue llevada a cabo en una hoja de cálculo aplicando lenguaje de programación "VisualBasic". Otro estudio interesante es la ECRM de *E. coli* en carne de ternera picada (FSIS/USDA, 2001). En ella se emplean diversos modelos de crecimiento, inactivación y D-R para llegar a la estimación final del riesgo. Un aspecto interesante en este último estudio es la utilización de una estructura de módulos, que separa el proceso de modelado según las fases a lo largo de la cadena alimentaria (matadero, producción y preparación). Por otro lado la FAO ha realizado multitud de evaluaciones de riesgo: *Salmonella* spp. en pollos para asar y en huevos; *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo; *Vibrio* spp. en pescados y mariscos; *Campylobacter* spp. en pollos para asar; y *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en preparados en polvo para lactantes (Table 4.1). En las evaluaciones de la FAO, aparte de estimar el riesgo y profundizar en los factores responsables del mismo, también subyace un propósito exploratorio que tiene el propósito de mostrar todas aquellas alternativas metodológicas en los procesos de modelado. Esto es especialmente evidente en los modelos D-R, los cuales normalmente merecen un mayor análisis (FAO/WHO, 2003) dada su papel crucial en la ER.

A pesar de estos avances, las carencias son aún notables. En nuestra opinión, el acoplamiento óptimo de la ECRM en el esquema de AR solo podrá llegar cuando las técnicas y los métodos empleados se encuentren validados y estandarizados. Debemos recordar que tanto la FAO como la UE, este último a través del libro blanco de seguridad alimentaria, han indicado la necesidad de mejorar y perfeccionar la metodología y técnicas empleados en la ECRM. El fin último es la confección de

guías que permitan realizar ECRMs de una manera más rutinaria y eficiente, además de hacer los resultados más comparables entre distintas evaluaciones. En este sentido, los procesos de sistematización puede ser un primer avance para el desarrollo de modelos más aplicables y comparables. Por otra parte, la estandarización de los métodos puede ser también clave en la comprensión de los resultados: la familiarización con una metodología posibilita que los gestores del riesgo, obligados a interpretar los resultados, puedan entender más fácilmente los aspectos claves de la ECRM. Los trabajos de Cassin y col. (1998) y Nauta (2001) son muestras del intento de uniformar y unificar las metodologías a través de una sistematización del proceso de modelado, aspecto que explicaremos más adelante en este apartado.

En el desarrollo de un modelo de ECRM, el proceso de modelado adquiere mayor importancia en la etapa de EE. El diseño y desarrollo de un modelo cuantitativo de EE, “determinista” o “probabilístico”, puede ser comparado a la construcción de un puzzle. En primer lugar, se examina la imagen completa que forma el puzzle para conocer donde se deben ajustar las piezas; traducido a nuestro caso, son las fases y procesos alimentarios (fabricación y manufactura, transporte, punto de venta, y preparación doméstica) que van a estar incluidos en nuestro modelo de EE, y que llamamos el objeto de la EE.

Las piezas del puzzle son representaciones compartimentadas de un sistema real, esto es, divisiones unitarias de fases y procesos alimentarios (subfases y subprocesos): tratamientos de inactivación, almacenamiento en refrigeración, loncheado, etc. Cada una de ellas puede ser descrita a través de ecuaciones matemáticas, es decir, con pequeños submodelos matemáticos. Al igual que cuando se ensamblan las piezas de un puzzle, los submodelos lo hacen mediante el establecimiento de relaciones matemáticas (división, suma, potencia, etc.) produciendo así la imagen completa del puzzle, o en nuestro caso, la representación matemática de las fases y procesos alimentarios que son el objeto de nuestra EE. Resumiendo, un modelo de EE debe, en primer lugar, definir el objeto que va a tratar, en segundo lugar, disgregarse en subprocesos para facilitar su definición matemática, y finalmente, establecer las relaciones entre todos ellos para obtener la estimación final objeto de la EE.

Cassin y col. (1998) propone integrar el esquema metodológico de la ERM según la CAC (1999) junto a la aplicación de la “Microbiología Predictiva” y el desarrollo de escenarios, para proporcionar una evaluación objetiva de las características higiénicas de un proceso alimentario. El Modelo del Proceso del Riesgo (MPR), como los autores denominan a este planteamiento, consta de dos partes. La primera describe el comportamiento del microorganismo a lo largo de las fases de procesado, manipulación y consumo del alimento, lo que daría lugar a la etapa de EE. Por otro lado, la segunda parte corresponde a un modelo D-R que estima el riesgo sanitario asociado al consumo de un alimento. Como se puede observar, este enfoque no dista mucho de lo explicado anteriormente, cuando se trató de manera general el uso de modelos en la ERM.

Tabla 4.1. Estudios publicados de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano

Orden ^a	Producto	Microorganismo(s)	Validación ^b	Referencia
1	Leche cruda	<i>Listeria monocytogenes</i>	NO	Bemrah y col., 1998
1	Hamburguesas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NO	Cassin y col. 1998
2	Carne vacuno picada	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NO	FSIS/USDA, 2001
2	Pollo	<i>Campylobacter</i> spp. termófila	NO	Rosenquist y col., 2003
1	Productos de pavo	<i>Salmonella</i> spp.	NO	Bemrah y col., 2003
1	Queso de leche cruda	<i>Staphylococcus aureus</i>	SI	Lindqvist y col., 2002
1	Cárnicos cocidos	<i>Listeria monocytogenes</i>	NO	Chen y col. 2003
2	Alimentos listos para el consumo	<i>Listeria monocytogenes</i>	SI	FDA/USDA/CDC, 2003
1	Carne de cerdo	<i>Salmonella</i> spp.	SI	Giovannini y col., 2004
1	Pollo	<i>Salmonella</i> spp.	NO	Oscar, 2004
2	Productos cárnicos tipo "Delicatessen"	<i>Listeria monocytogenes</i>	SI	FSIS/USDA, 2003
2	Productos origen animal	<i>Salmonella</i> spp.	NO	Hald y col., 2004
1	Queso leche cruda	<i>Listeria monocytogenes</i>	NO	Sanaa y col., 2004
1	Huevo pasteurizado	<i>Salmonella Enteritidis</i>	NO	Whiting y Buchanan, 1997
1	Pollo crudo	<i>Campylobacter</i> spp.	NO	Harnett y col., 2002
2	Alimentos listos para el consumo	<i>Listeria monocytogenes</i>	NO	FAO/WHO, 2004
2	Ostras crudas	<i>Vibrio vulnificus</i>	SI	FAO/WHO, 2005b
2	Huevos y pollo crudo	<i>Salmonella</i> spp.	NO	FAO/WHO, 2002
1	Carne vacuno picada ("tartare")	<i>Escherichia coli</i> O157	SI*	Nauta y col. 2001 ^a
2	Carne lista para consumo/carne de ave	<i>Salmonella</i> spp.	NO	FSIS/USDA, 2005b
2	Ovo-productos y huevos	<i>Salmonella enteritidis</i> y <i>Salmonella</i> spp.	NO	FSIS/USDA, 2005c
2	Carnes procesadas y productos de ave	<i>Clostridium perfringens</i>	NO	FSIS/USDA, 2005a
2	Ostras crudas	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SI	CFSAN/FDA, 2005

^a Referido a modelos de primer(1) o segundo orden (2); ^b procesos de validación con datos externos (SI/NO)

Por otro lado, la metodología descrita por Nauta (2001, 2002 y 2005) y Nauta y col. (2001) va un paso más allá tanto en detalle como en sistematización. El denominado Modelo Modular del Proceso del Riesgo (MPRM) es una evolución del MPR propuesto por Cassin y col. (1998) para su aplicación en la etapa de EE. Básicamente, este planteamiento propone que cualquier fase a lo largo de la cadena alimentaria puede ser descrita matemáticamente a través de tres 6 procesos básicos: crecimiento, inactivación, mezcla, partición del alimento, eliminación de una parte de la unidad, y contaminación cruzada (Tabla 4.2). Nuevamente vuelve a surgir el concepto de compartimentación, como mencionamos anteriormente, pero en este caso, se llega a un mayor grado de simplificación. A través de la aplicación de 6 tipos de modelos se puede lograr una estimación objetiva y certera de los niveles de exposición a un patógeno desde un proceso alimentario determinado. Según Nauta (2001), el modelo objeto de la EE debe ser dividido en pequeñas partes, tantas como sean necesarias para expresar la lógica entre las variables (“inputs”) y así modelar de la manera más exacta posible la relación entre ellas, todo ello acorde a los propósitos u objetivos de nuestra evaluación. La principal ventaja de este método radica en la sistematización y simplificación del proceso de creación del modelo, por ello, quizás, recientemente, ha sido motivo de en un informe técnico de la Comisión Europea (European Commission, 2003) donde se pretenden establecer las bases sobre la metodología de EE en el contexto de ECRM. Un ejemplo de aplicación del método MPRM es el estudio de Pérez-Rodríguez y col. (2003), en el cual se desarrolló un modelo matemático de EE para *L. monocytogenes* en jamón cocido.

Tabla 4.2. Efecto cualitativo sobre prevalencia, concentración y tamaño de la ración de los seis procesos básicos propuestos por Nauta (2001) y Nauta y col. (2001). “=”: no efecto; “+”: incremento; “-”: un decremento (adaptado de European Commission, 2003).

Proceso	Efecto sobre Prevalencia	Efecto sobre concentración	Efecto sobre el tamaños de ración
Crecimiento	=	+	=
Inactivación	-	-	=
Mezcla	+	=	+
Partición	-	=	-
Eliminación	-	-	=
Contaminación cruzada	+	=/+	=

4.5. Tipos de modelos en la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano

Los modelos empleados en la ECRM son diversos. Entre todos ellos, destacamos los **modelos de crecimiento, inactivación, supervivencia y probabilidad** como la piedra angular en el desarrollo de la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM); de hecho un modelo de ECRM podría constar sólo de modelos de crecimiento e inactivación. Este tipo de modelos son el objeto principal de estudio del área de la “Microbiología Predictiva”. A pesar de su temprano comienzo en 1920 como consecuencia del interés en producir alimentos enlatados “estériles” (Bigelow y col., 1920), sólo en los últimos 20 años se han obtenido los

avances más significativos, que han puesto los modelos a disposición de industriales y de organismos oficiales para un mejor control de los procesos.

Por otra parte, recientemente, en esta misma área han surgido otros tipos de modelos denominados de “**contaminación cruzada**”, que aunque muestran un menor desarrollo, sí se ha comprobado su importancia en la estimación del riesgo para algunos microorganismos patógenos y escenarios (Beumer y col., 2003). Los modelos de contaminación cruzada, son modelos que tratan sobre la capacidad de transferencia de los microorganismos entre superficies o ambiente (alimentos, superficies de trabajo, aire, etc.) y el alimento, prediciendo el número de microorganismos transferidos de una superficie a otra. Un ejemplo de la importancia de estos modelos es el caso de los virus. El número de partículas víricas transferidas durante un proceso de contaminación cruzada toma una mayor relevancia en el riesgo como consecuencia de la imposibilidad de estos para multiplicarse en el alimento.

Los **modelos D-R** son el argumento principal en el desarrollo de la etapa de CP, y la herramienta fundamental para traducir los valores de exposición desde la etapa EE en unidades de riesgo en la CR. Aunque como contrapartida, también estos son una fuente importante de incertidumbre dado el elevado desconocimiento de los procesos implicados en los mecanismos de infección que darán lugar a la enfermedad. En este apartado haremos una clasificación de las funciones matemáticas y su base teórica. También se hará un especial hincapié en las limitaciones que presentan este tipo de modelos, y que, evidentemente, contribuyen al incremento de la incertidumbre en una ECRM.

Existen otros modelos de interés para la ECRM. Por ejemplo, tenemos los modelos que describen el comportamiento de los manipuladores. Estos incorporan en la ECRM los patrones de consumo, el nivel de higiene durante la preparación, y su asociación con factores socio-culturales, de género, edad, etc. (Christensen y col., 2005). Su uso en la etapa de EE posibilita identificar aquellos factores de riesgo relacionados con aspectos socio-culturales. También en la etapa de EE se aplican distribuciones de probabilidad para describir la distribución de los microorganismos en el alimento (concentración y prevalencia); en muchos casos una mala elección de la distribución de probabilidad (por ej., mal ajuste a los datos) puede implicar errores importantes de exactitud en las predicciones del modelo. Por ello, es importante analizar en primer lugar los datos de la distribución del microorganismo en el alimento, y después decidir sobre la distribución que mejor se adapta a estos datos (matemática y teóricamente) (McKellar y Lu, 2004; Haas y col., 1999). Finalmente, también en la EE, se aplican otros tipos de modelos cuantitativos que reflejan los cambios de concentración y prevalencia en el alimento como consecuencia de procesos de mezcla, partición del alimento y eliminación (Nauta 2001 y Nauta y col., 2001).

4.5.1. Modelos cinéticos

Estos modelos utilizan información sobre características del microorganismo, producto y proceso para predecir a través de ecuaciones matemáticas los cambios

de concentración y prevalencia del microorganismo en el alimento (Legan y col., 2002). Basados en la naturaleza de la respuesta microbiana, los modelos cinéticos pueden ser clasificados en: modelos de **crecimiento**, modelos de **inactivación** y modelos de **supervivencia**.

A lo largo de su historia, la “Microbiología Predictiva” ha mostrado un gran interés en diferenciar entre dos conceptos de modelo: **empíricos** y **mecanicistas**. La diferencia es conceptualmente clara, aunque en la práctica no sea así. Un modelo empírico se desarrolla a través de medidas experimentales sin considerar los procesos físicos, fisiológicos o bioquímicos subyacentes. En cambio, el desarrollo de un modelo mecanicista parte del conocimiento teórico del comportamiento microbiano y su traducción a términos matemáticos. Este último plantea una mayor dificultad en su diseño debido a la todavía falta de conocimiento sobre los procesos implicados en la cinética microbiana. De ahí que la mayoría de los modelos sean cuasi-mecanicistas (Baranyi y Roberts, 1994), esto es, modelos que incorporan tanto parámetros de explicación matemática, como fisiológica. A pesar de todo, aún es posible encontrar algún raro ejemplo de modelo puramente mecanicista, como es el caso del modelo desarrollado por Cayley y col. (1992), donde se relaciona el crecimiento de una cepa de *E. coli* bajo condiciones de estrés osmótico con la acumulación intracelular de betaina y prolina y la termodinámica de osmoregulación. Esta dicotomía de enfoques está siempre presente en las discusiones y aunque se asuma que los modelos mecanicistas son el objetivo principal de la investigación científica, la gran mayoría de ellos en la “Microbiología Predictiva”, salvo algunas excepciones, son de tipo empírico. Por ello, en el presente apartado trataremos de modelos empíricos, y en algunos casos, cuasi-mecanicistas, mostrando sus ventajas y desventajas en su aplicación en la ECRM.

Una primera clasificación de la “Microbiología Predictiva” se basa en el nivel de descripción y desarrollo de los modelos. Así, dentro de los modelos cinéticos modelos **primarios**, **secundarios** y **terciarios**. Los primarios son ecuaciones matemáticas que describen el cambio del número de bacterias con el tiempo bajo condiciones particulares del ambiente y del cultivo. Los secundarios son ecuaciones que describen la variación de los parámetros de crecimiento derivados de los modelos primarios. Por último, los modelos terciarios son aplicaciones de uno o más modelos primarios y secundarios a través del uso de programas informáticos. Entre los más extendidos se encuentra el “Pathogen Modeling Program” (PMP) desarrollado por la USDA y disponible gratuitamente en internet <<http://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm>>. Este modelo terciario proporciona estimaciones para microorganismos patógenos en procesos de inactivación y crecimiento en función de distintos factores ambientales. Más recientemente, se ha desarrollado otro programa informático de similares características llamado “Combase Predictor” elaborado por el Institute of Food Research (IFR) y disponible a través de internet <<http://www.combase.cc/predictor.html>>. Además, “Combase” es también una base de datos que suministra información de crecimiento e inactivación microbiana a través de Internet <<http://wyndmoor.arserrc.gov/combase/>>.

Modelos de crecimiento

Los modelos de crecimiento se ocupan del rango de condiciones que permiten crecimiento. Este tipo de modelos describen el incremento de la concentración microbiana a lo largo del tiempo (cinético) y se basan en las curvas de crecimiento obtenidas a distintas condiciones factoriales (Figura 4.7)

Los modelos de crecimiento primarios son ecuaciones matemáticas que describen el cambio en la población microbiana en función del tiempo a través de los parámetros, tasa de crecimiento, tiempo de latencia o adaptación (lag) y la densidad máxima de población (DMP). Entre las distintas propuestas, las ecuaciones más comúnmente empleadas son la ecuación modificada de Gompertz, la ecuación de Baranyi (ver Tabla 4.3) y la logística. Las dos primeras ecuaciones están basadas en la forma sigmoidal de la curva de crecimiento microbiano, y la última, en el desarrollo la ecuación diferencial que describe el crecimiento exponencial, en la fase exponencial de crecimiento.

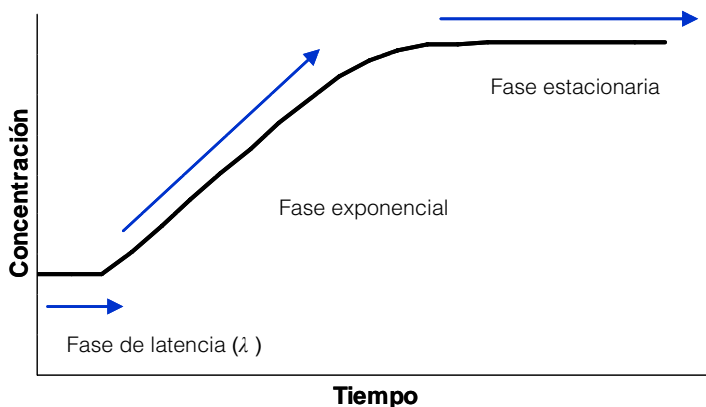


Figura 4.7. Curva de crecimiento microbiano que engloba cuatro fases: Fase de latencia; Fase exponencial, Fase estacionaria.

Los modelos secundarios relacionan matemáticamente los parámetros derivados de los modelos primarios (tasa de crecimiento, tiempo de adaptación y la DMP) con los factores ambientales intrínsecos y extrínsecos. La variedad de modelos es extensa. En la Tabla 4.3 se presentan aquellos modelos de más extendida aplicación en la bibliografía científica.

Los modelos polinomiales, también llamados Modelo de Superficie de Respuesta (MSR) son los modelos secundarios más usados en "Microbiología Predictiva", en primer lugar, por el buen ajuste a los datos experimentales y en segundo lugar por su fácil desarrollo matemático. Sin embargo, ciertas limitaciones los hacen menos preferibles con respecto a otros tipos de modelos. Estos modelos sólo pueden aplicarse en la región de interpolación, ya que extrapolaciones en los mismos producen predicciones erróneas y no lógicas (Baranyi y col., 1996).

Asimismo, la región de interpolación es más estrecha que para otros tipos de modelos. Estas limitaciones se traducen en desventajas en su aplicación para la ECRM. Así, aunque son fáciles para implementar tanto en hojas de cálculo, como en otros soportes informáticos, la estrecha región de interpolación y la imposibilidad de realizar extrapolaciones reducen la posibilidad de incluir nuevos rangos de factores en los modelos de ECRM. Como alternativa a estas limitaciones tenemos los modelos llamados de raíz cuadrada, tipo Ratkowsky o tipo Bêlerádek (McMeekin y col., 1993) que tienen como base de desarrollo el modelo propuesto por Ratkowsky y col. (1982):

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b \cdot (T - T_{\min}) \quad (4.1)$$

donde μ_{\max} es la tasa máxima específica de crecimiento expresada en ln ufc/ml, b es una constante y T es la temperatura. El parámetro T_{\min} es la temperatura mínima teórica a partir de la cual se detecta crecimiento. También, existe una versión extendida de la ecuación 4.1 que incluye el parámetro más la temperatura máxima que define el valor de temperatura por encima del cual no existe crecimiento (Ratkowsky y col., 1983)

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b (T - T_{\min}) + [1 - \exp(c \cdot (T - T_{\max}))] \quad (4.2)$$

Esta base matemática puede ser extendida para incluir el efecto de otros factores ambientales (actividad de agua, pH, CO_2 , etc). Por ejemplo, McMeekin y col. (1987) propuso un modelo de crecimiento para *Staphylococcus xylosus* en función de la temperatura y actividad de agua, adicionando un término multiplicativo para el nuevo factor en la ecuación 4.1:

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b(T - T_{\min})\sqrt{(a_w - a_{w\min})} \quad (4.3)$$

El mismo ejemplo pero para el factor pH fue desarrollado por Adams y col. (1991) quien encontró el mismo efecto multiplicativo para el caso del pH.

El concepto gamma fue introducido por Zwietering y col. (1992). Este planteamiento se fundamenta en dos premisas:

1. Se ha observado que muchos factores afectan al crecimiento bacteriano de manera independiente. Por tanto, su efecto total puede ser representado como la multiplicación del efecto individual de cada factor.

2. El efecto sobre la tasa de crecimiento puede ser expresado como una fracción de la tasa máxima de crecimiento (la tasa cuando los factores ambientales están a un nivel óptimo)

Bajo condiciones óptimas la tasa de crecimiento se hace máxima. Sin embargo, según el concepto gamma, este valor se reduce a niveles subóptimos como consecuencia del efecto inhibitorio acumulativo de los factores. El efecto de cada factor es representado por una función gamma, que es adimensional, cuyo valor oscila entre 0 y 1. Cuando no existe inhibición la función toma el valor 1, en cambio, cuando el efecto inhibitorio es máximo, la función toma el valor 0. La multiplicación de

las funciones gamma para cada factor proporciona el efecto inhibitorio total acumulado. Así, la tasa de crecimiento a distintos niveles de los factores viene determinada por la ecuación (modelo gamma):

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \delta(T) \cdot \delta(a_w) \cdot \delta(pH) \quad (4.4)$$

El modelo gamma es de gran aplicabilidad en la ECRM, puesto que la base matemática que lo sustenta permite que pueda ser completado con términos de otros modelos para incluir un nuevo factor no incluido previamente. Esto posibilita, en un modelo de ECRM, realizar modificaciones de una manera fácil, para así evaluar nuevos factores sin necesidad de cambiar de modelo base.

Tabla 4.3. Modelos primarios usados para describir el crecimiento microbiano

Modelo	Ecuación	Donde:
Exponencial	$\log(n) = \log(n_0) - \mu_{\max} t$	$n =$ ufc/g a tiempo t $n_0 =$ ufc/g a tiempo $t=0$ $t =$ tiempo (h) $\mu_{\max} =$ tasa máxima de crecimiento (h^{-1})
Lag-exponencial	$\log(n) = \log(n_0) - \mu_{\max} (t - \lambda)$	$\lambda =$ tiempo de latencia lag (h)
Baranyi	$n(t) = n_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{\exp(m\mu_{\max} A(t) - 1)}{\exp(m\mu_{\max} - 1)} \right)$	$m =$ representa la curvatura existente entre la fase exponencial y la estacionaria. $n_{\max} =$ población máxima (ufc/g) $A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{e^{-\mu_{\max} t} + (e^{\lambda \mu_{\max} - 1})^{-1}}{1 + (e^{\lambda \mu_{\max} - 1})^{-1}} \right)$
Gompertz	$\log(n) = A + C \exp[-\exp(-B(t - M))]$	$B =$ tasa máxima de crecimiento (h^{-1}); $M =$ el tiempo al cual ocurre la tasa máxima de crecimiento (h); $A =$ máxima asíntota de \log_{10} ufc/g; $C =$ la diferencia entre A y la asíntota inferior de \log_{10} ufc/g

Otros modelos más sofisticados como las redes neuronales artificiales han mostrado un excelente ajuste a los datos, con una buena capacidad de predicción. Sin embargo en su aplicación en los modelos ECRM pueden presentar una mayor dificultad técnica a la hora de su implementación, dada la elevada complejidad de las funciones que acompañan este tipo de modelos. Esto es especialmente destacable en los modelos desarrollados en hojas de cálculo, donde la gran cantidad de funciones, parámetros y transformaciones para escalado que hacen más costosa y larga su implementación.

Aunque la mayor parte de los modelos secundarios son específicos para la tasa de crecimiento, también existen en la literatura científica modelos para el tiempo lag y, en menor medida, para la DMP (máxima concentración que puede alcanzar un microorganismo).

Los primeros han tenido un mayor desarrollo, y su inclusión en una ECRM podría tener un gran impacto sobre el resultado. En muchos casos, con condiciones limitantes en el alimento, el hecho de que el alimento alcance o supere un determinado nivel crítico para un microorganismo puede estar determinado por la duración de la fase o tiempo lag. Dada la relación existente entre el tiempo de latencia y la tasa de crecimiento (Baranyi y Robert, 1994), alguna que otra ECRM ha descrito este parámetro mediante esta simple ecuación (Cassin y col., 1998):

$$\text{lag} = A + B/\mu_{\max} \quad (4.5)$$

donde A y B son parámetros de regresión y μ_{\max} es la tasa máxima de crecimiento.

Como inconveniente, estos modelos son mucho más inexactos e imprecisos en sus predicciones. La explicación radica en que el tiempo lag no solo está influido por los factores ambientales sino también por las condiciones de preincubación del microorganismo (condiciones ambientales previas a la realización del experimento) afectan a este parámetro cinético (McMeekin y col., 1993; Baranyi y col., 1995; Mellefont y Ross 2003; Swinnen y col., 2004). Esta incapacidad para predecir de manera fiable, unida al elevado grado de variabilidad asociado al parámetro han determinado que el enfoque estocástico sea considerado en algunos casos el más adecuado para describir el parámetro; esto es, usar una distribución de probabilidad en lugar de un modelo matemático para el tiempo lag (Metris y col., 2005).

Los modelos de DMP son considerados por la literatura de menor importancia. En su aplicación para la ECRM se debe evitar la utilización de modelos que no incluyen el efecto de la flora microbiana acompañante o competitiva, puesto que dichos modelos pueden sobreestimar el valor del parámetro en un rango de 1-2 logaritmos. En la bibliografía podemos encontrar modelos en medios de cultivo que incluyen el efecto adicional de la flora microbiana alterante, sin embargo las evaluaciones cuantitativas raramente han incluido este tipo de modelos. Así, en los modelos de ECRM se han tomado distintas alternativas:

1. Utilización de datos sobre la DMP obtenidos en alimentos ("challenge tests") y ajuste de un modelo lineal del tipo $DMP = K \cdot T + C$, donde K y C son parámetros de regresión y T es la temperatura de crecimiento, considerada como el factor con mayor impacto sobre la DMP. En la Figura 4.8 se representa la estructura de un modelo "lógico" de DMP dependiente de la temperatura. Este mismo planteamiento puede ser aplicado también en el caso del parámetro tiempo lag.

2. Basado en que sólo niveles altos de flora competitiva ejercen un efecto significativo sobre el crecimiento de patógenos (Malakar y col., 2003), se han utilizado modelos cinéticos de flora competitiva para conocer su concentración a lo

largo de los procesos de almacenamiento, y en función de la misma, aplicar un factor de reducción sobre la tasa de crecimiento del patógeno.

Otro aspecto importante en cuanto a los modelos de crecimiento es el modelado del crecimiento en condiciones dinámicas, esto es, cuando los niveles de los factores cambian en función del tiempo. Bernaerts y col. (2004) destacaron la necesidad de desarrollar este tipo de modelos, puesto que aquellos realizados en condiciones estáticas pueden errar en sus predicciones. Sin embargo, a pesar de su existencia en la bibliografía (Baranyi y Roberts, 1994; McKellar, 2001), no se han aplicado en la ECRM, debido probablemente, a su elevada complejidad matemática y a la escasez de modelos disponibles para algunos microorganismos.

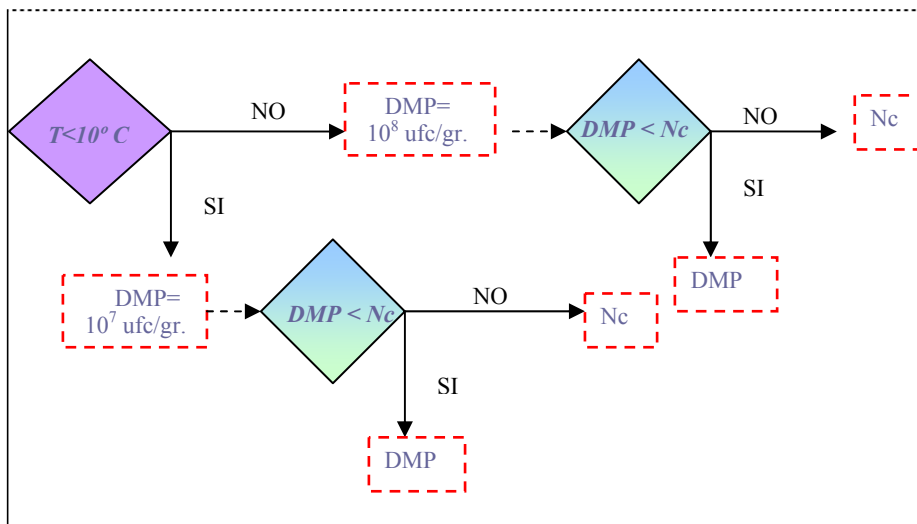


Figura 4.8. Esquema del modelo de densidad de población máxima (DMP) dependiente de la temperatura utilizado para el estudio de ECRM de *Staphylococcus aureus* en cárnicos cocidos en España (no publicado). Los rombos representan sentencias condicionales en el modelo de tipo “Si...”. Nc: concentración después de aplicar el modelo de crecimiento. DMP: límite máximo de crecimiento dependiente de la temperatura.

Modelos de inactivación

Los modelos de muerte o inactivación son aplicados para estimar el ratio de muerte microbiana como consecuencia de un proceso de destrucción, generalmente térmico. La mayoría de ellos fueron desarrollados a raíz de su aplicación en el diseño de procesos térmicos más efectivos contra microorganismos patógenos y alterantes; sin embargo, los modelos de inactivación pueden ser también aplicados para describir el efecto de tratamientos de irradiación o procesos de alta presión. Es importante mencionar que son procesos cinéticos que describen la inactivación en función del tiempo de tratamiento letal.

Los modelos de inactivación pueden ser clasificados en modelos lineales basados en una cinética de muerte de primer orden y en modelos no lineales cuando

se asume una heterogeneidad de la población en cuanto a su sensibilidad o resistencia al tratamiento de inactivación. Estos últimos son un conjunto de modelos más recientes pensados como alternativa a los modelos lineales, dada las desviaciones a la linealidad (log) que se han observado para algunos procesos de inactivación. Entre los modelos más comunes se encuentran la ecuación logística y la de Gompertz (van Gerwen and Zwietering, 1998) (Tabla 4.4). Muchos de los conceptos mencionados para los modelos de crecimiento pueden ser aplicados a este grupo. Así, en los modelos de muerte también encontramos modelos secundarios (Tabla 4.5).

Tabla 4.4. Modelos primarios comúnmente empleados para describir curvas de inactivación microbiana (adaptado de Legan y col., 2002).

	Ecuación	Donde:
Exponencial	$\log(n) = \log(n_0) - kt$	n = recuento/g a tiempo t t = tiempo k = una constante de tasa También: $1/k = D$ = tiempo necesario para alcanzar una reducción decimal ufc/g
Logístico	$\log(n) = \log(n_0) + \frac{a}{1 + \exp(b - ct)}$	n = recuento/g; n_0 = recuento/g cuando t = cero; t = tiempo (horas); a , b y c son los parámetros de ajuste; t = tiempo (horas)
Weibull acumulativa	$s = \exp(-bt^n)$ o $\log(s) = -bt^n$	s = fracción de supervivencia (n/n_0) a tiempo t b = parámetro de escala n = parámetro de forma
Gompertz	$L(t) = A + C \exp[-\exp(-B(t - M))]$	$L(t)$ = \log_{10} recuento bacteriano a tiempo t ; B = tasa relativa de muerte máxima(h^{-1}); M = el tiempo al cual ocurre la tasa de muerte (h); A = máxima asíntota de \log_{10} recuento bacteriano C = la diferencia entre A y la asíntota inferior de \log_{10} recuento bacteriano.

Modelos de supervivencia

Estos modelos describen la inactivación no térmica bajo condiciones (niveles de los factores) no extremas, y frecuentemente fuera de los límites de crecimiento. Procesos tales como el calentamiento del alimento a valores alrededor de 50-60 °C, desecación en superficies, la presencia de sustancias tóxicas-inhedoras, etc. son situaciones adecuadas para ser descritas por este tipo de modelos. Podríamos decir que estos procesos son un caso específico de inactivación donde el proceso de

muerte se produce de manera más lenta. Son menos frecuentes que los grupos anteriores; y aunque los datos son tratados de la misma forma que en el caso de los modelos de inactivación, la selección utilizada es algo diferente (Legan y col. 2002). Su inclusión en modelos de ECRM puede ser clave, por ej., los procesos de supervivencia en superficies o el ambiente (aire, aerosoles, charcos, etc.) son determinantes en los procesos de recontaminación. El número de células transferidas dependerá de la cantidad que sobreviva a las condiciones de estrés normalmente presentes en estas situaciones.

Tabla 4.5. Ejemplos de modelos secundarios de inactivación microbiana (adaptado de Legan y col., 2002).

Modelo	Ecuación	Donde:	Comentarios
Polinomial	$C_0 + C_1 V_1 + C_2 V_2 + C_3 V_1 V_2 + C_4 (V_1)^2$	Todos los C son constante y los V son variables	Modelo fácil de aplicar por regresión lineal múltiple. No existe significado biológico para los parámetros
Tipo Arrhenius	$k = A \exp(-E_a/RT)$	K es la constante de tasa de muerte; A es el "factor de colisión"; E_a es la energía de inactivación del sistema; R es la constante universal de los gases (8,31 J/mol/K); y T es la temperatura en Kelvin	Los parámetros no tienen significación biológica. Ha sido adaptado para otros parámetros, como por ej., pH. No predice valores limitantes para las variables
Concepto τ	$\tau = \frac{T_2 - T_1}{\log D_{T_1} - \log D_{T_2}}$	τ es la temperatura necesaria para un cambio decimal en el valor D ; D es el tiempo necesario para obtener una reducción decimal en los supervivientes; T_1 es la temperatura más baja; T_2 la temperatura más alta	Asume una cinética de primer orden

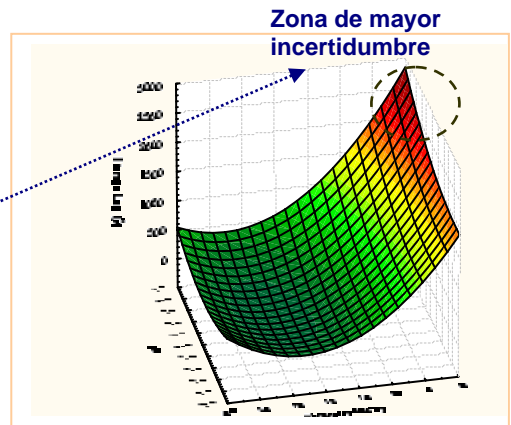
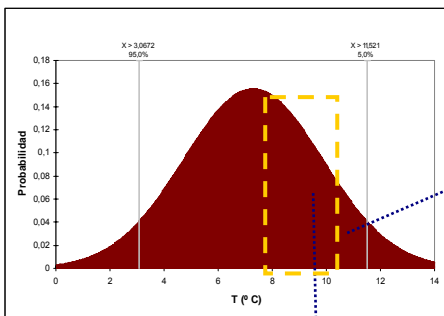
4.5.2. Modelos de crecimiento/no crecimiento y modelos de probabilidad

Los **modelos de crecimiento/no crecimiento** son una extensión de los modelos de crecimiento, y definen los límites de un grupo de condiciones que permiten o no crecimiento del microorganismo. En el caso de las bacterias, la temperatura probablemente sea el factor más significativo sobre la determinación de la zona de crecimiento y de no crecimiento. Este hecho toma más relevancia en el caso de

temperaturas de refrigeración donde la respuesta microbiana es especialmente variable (ver Figura 4.9).

Por otro lado, también podemos estar interesados en definir los límites de crecimiento para factores tales como pH, actividad de agua, ácido cítrico, etc. Otra variante de estos modelos son aquellos que estiman el tiempo necesario para que se produzca crecimiento, basándose, para ello, en datos cualitativos del tipo crecimiento/no crecimiento, que son recogidos a determinados intervalos de tiempo. Debido a la presencia de datos censurados, se aplican técnicas de regresión propias del "análisis de supervivencia".

Temperatura de refrigeración doméstica



Zona de crecimiento/ no crecimiento

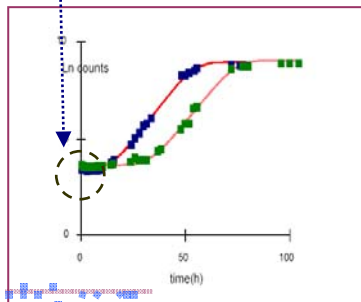


Figura 4.9. Representación pictórica del impacto de las temperaturas de refrigeración en el grado de precisión de los modelos de crecimiento

Los modelos de crecimiento/no crecimiento actúan como complementarios a los modelos de crecimiento propiamente dichos, ya que ayudan a determinar las condiciones que se deben incluir en el diseño de estos últimos. La combinación de ambos tipos de modelos puede entenderse más claramente si acudimos a un enfoque práctico de ECRM. Por ejemplo, un modelo de crecimiento/no crecimiento se utilizaría para determinar si las condiciones de una supuesta fase de almacenamiento (temperatura, tiempo de almacenamiento, pH, etc.) permiten crecimiento o no. Si el resultado es crecimiento, se aplicaría a continuación el modelo de crecimiento propiamente dicho para estimar la concentración de este tras el tiempo de almacenamiento. En caso de no crecimiento, el modelo cinético no sería aplicado, y por tanto, el valor de concentración tras el almacenamiento sería igual al inicial.

Los modelos de crecimiento/no crecimiento también pueden incorporar probabilidad cuando se realicen con varias repeticiones en el diseño experimental. Estos **modelos** llamados de **probabilidad** estiman, por tanto, la probabilidad de crecimiento (si el microorganismo crece o no) dentro de un intervalo de tiempo usando para ello funciones matemáticas de tipo logístico, lineal y no lineal. Nuevamente, su aplicación en la ECRM está unida a los modelos cinéticos, y proporciona una componente “probabilística” a la evaluación cuantitativa del crecimiento; no solo indican si crece o no crece, sino que además, detalla con que frecuencia lo haría. Por ejemplo, en el caso anterior, a unas determinadas condiciones de almacenamiento, el modelo podría predecir una probabilidad de crecimiento del 50%. Esto significaría que, en la simulación, de 100 iteraciones, 50 darían crecimiento, y por tanto se aplicaría el modelo cinético, y otras 50 darían no crecimiento, manteniéndose la concentración al nivel inicial (antes del almacenamiento).

4.5.3. Modelos Dosis-Respuesta

Básicamente, un modelo D-R es una función matemática que toma como argumento una medida de la dosis (número de células ingeridas) y devuelve como resultado la probabilidad de un efecto adverso asociado (infección, enfermedad, muerte, etc.). El valor de probabilidad oscila en el rango 0 -1, donde 0 indica ausencia de efecto y 1 aparición completa del efecto.

La principal razón por la que se usan modelos de D-R estriba en que la contaminación en alimentos y los efectos adversos asociados son de tan baja frecuencia que los métodos de observación directa no son efectivos en la detección y recogida de información; de ahí que para evaluar el riesgo se necesite de modelos (generados con altas dosis) que faciliten la extrapolación hacia dosis más bajas.

La exposición a un microorganismo patógeno puede ocasionar diferentes tipos de respuestas en el hospedador como muestra la Figura 4.10. Por ejemplo, la ingestión de un microorganismo en una población provocará la infección de una fracción de la población (P_i). La infección se manifiesta como una multiplicación de microorganismo en el interior del hospedador, seguido por su eliminación. Las determinaciones analíticas de anticuerpos y el aumento de la temperatura corporal (fiebre) pueden ser indicativos de infección. A continuación, de los infectados, un proporción $P_{P,i}$ enfermarán, y de estos, finalmente, una fracción $P_{M,D}$ morirán (Figura 4.10).

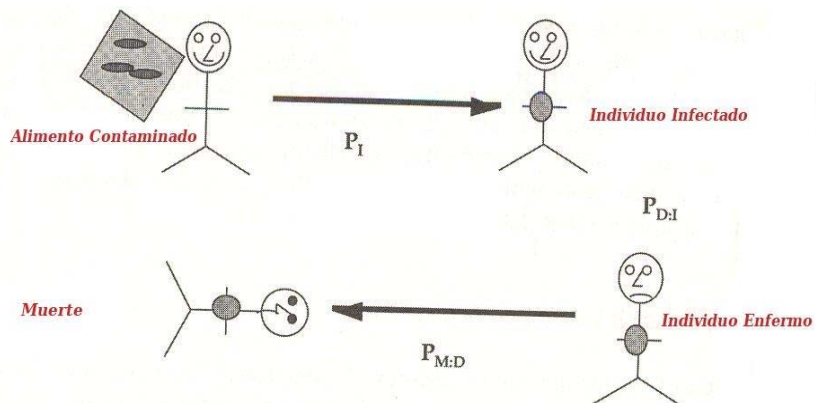


Figura 4.10. Representación pictórica de los puntos finales que puede ser resultado de la exposición a microorganismos (adaptado de Haas y col., 1999)

En base al tipo de respuesta que se considere, los modelos pueden ser clasificados en:

- Modelos dosis-infección
- Modelos dosis-enfermedad
- Modelos dosis-muerte.

Para describir matemáticamente la relación entre la dosis y probabilidad de un efecto adverso, debemos atender a la siguiente premisa, que aunque lógica, es determinante en la elección del tipo de función: cuando la dosis aumenta, la probabilidad de ocurrencia de un efecto adverso será mayor. Por tanto, sólo se pueden utilizar funciones de probabilidad acumulativas para este tipo de modelos. Asimismo, se ha observado que la respuesta de un grupo de individuos expuestos a una dosis (frecuentemente expresada en unidades logarítmicas) presenta una forma sigmoideal (ver Figura 4.11). Existen numerosas funciones matemáticas que cumplen estas condiciones, y que por tanto, serían apropiadas para su utilización como modelo D-R. Sin embargo, cuando se extrapola fuera del rango de los datos experimentales, muchos de estos modelos dan lugar a predicciones de escasa precisión (Coleman y Marks, 1998; Holcomb y col., 1999). Los modelos de mayor aceptación parten, para su desarrollo matemático, de hipótesis teóricas sobre la actuación del microorganismo en el hospedador, esto es, consideran la interacción entre los tres factores, matriz del alimento, patógeno y hospedador.

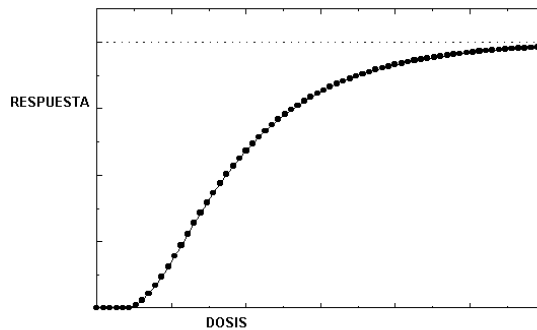


Figura 4.11. Curva sigmoide que describe la respuesta fisiológica (efecto adverso) de un ser vivo a la exposición a un microorganismo patógeno

Como previo a la descripción de los modelos, debemos considerar, como en el caso de la “Microbiología Predictiva”, la separación entre modelos mecanicistas y empíricos. La clasificación de los modelos D-R en uno otro grupo ha dado lugar a diferentes enfoques. Según Haas y col. (1999), el modelo exponencial y beta-Poisson son modelos mecanicistas puesto que son desarrollados sobre la base de varias hipótesis relacionadas con la variabilidad e infectividad del microorganismo o susceptibilidad del hospedador. Para Haas y col. (1999) funciones tales como la log-logístico, log-probit y Weibull-gamma son empíricas debido a que se limitan únicamente a describir el rango de datos. Sin embargo, Buchanan y col. (2000) ponen en duda el hecho de que los modelos mencionados por Haas y col. (1999) como mecanicistas lo sean, puesto que ellos afirman que la principal justificación para su uso recae en el buen ajuste a los datos, y no tanto en su profundización sobre el mecanismo de acción del patógeno (McLauchlin y col., 2004). Por ello, Buchanan y col. (2000) definen los modelos mecanicistas como aquellos que describen la relación D-R como resultado del modelado compartimentado del mecanismo infección/enfermedad: barrera acidez gástrica, adhesión/infectividad y morbilidad/mortalidad. El resto de modelos, donde se incluyen tanto los modelos mecanicistas y empíricos de Haas y col. (1999), son clasificados por Buchanan y col. (2000) como empíricos.

En opinión de Buchanan y col. (2000), los modelos mecanicistas son la alternativa para mejorar las predicciones por extrapolación donde habitualmente fallan los modelos empíricos. Sin embargo, existen pocos modelos de este tipo, en parte debido a la todavía falta de conocimiento sobre el modo en que interaccionan los tres factores de la triada epidemiológica. En la presente revisión trataremos los modelos recogidos como mecanicistas por Haas y col. (1999) ya que son los más utilizados, y explicaremos la base teórica que los sustenta.

Base teórica y modelos mecanicistas

Hipotéticamente, para que ocurra un proceso de infección se requiere que ocurran secuencialmente dos subprocesos:

* El hospedador debería ingerir uno o más microorganismos con capacidad de producir efecto adverso.

* Muchos de los microorganismos son eliminados o destruidos por diferentes mecanismos de defensa del hospedador, de modo que sólo una fracción de los microorganismos ingeridos alcanzará el sitio donde la infección puede comenzar.

Estas hipótesis implican, en términos matemáticos, que la probabilidad de infección, $P(k)$, es el producto de la probabilidad de ingerir una cantidad j microorganismos a través de una dosis (d), $P_1(j/d)$, por la probabilidad de que un número k de microorganismos sobrevivan para iniciar el procesos de infección, $P_2(k/j)$:

$$\sum_{j=1}^{\infty} P_1(j/d) P_2(k/j) \quad (4.6)$$

A partir de la ecuación 4.6 se pueden derivar un importante número de funciones D-R. La forma en que son definidos los parámetros P_1 , P_2 , y k_{\min} que es la dosis mínima infectiva, determinará el tipo de modelo D-R obtenido.

A la hora de desarrollar los modelos se puede tomar dos alternativas, según se considere o no la existencia de un umbral de infección. En base a esta consideración, los modelos pueden ser clasificados en:

* Modelos con umbral de infección ("threshold models"): La infección solo puede tener lugar a partir de un determinado número de microorganismos patógenos inoculados (dosis mínima infectiva).

* Modelos sin umbral de infección ("non-threshold models"): No es necesario alcanzar un número determinado de patógenos inoculados para posibilitar la infección.

Existen dos conjuntos de hipótesis que son determinantes para el desarrollo matemático de cualquier modelo:

* La hipótesis de acción independiente y de acción cooperativa. La primera hipótesis viene a decir que la probabilidad de causar infección por cada microorganismo patógeno inoculado es distinta de cero e independiente del número total de microorganismos inoculados. En cambio, la segunda hipótesis afirma que la probabilidad de infección por cada microorganismo patógeno sí es dependiente del número de microorganismos inoculados.

* El concepto de "single-hit" y "multi-hit". La primera afirma que un único microorganismo patógeno, por sí solo, es capaz de producir infección, o lo que es lo mismo $k_{\min} = 1$. La hipótesis de "multi-hit concept" resumida a términos matemáticos afirma que $k_{\min} > 1$. Los modelos de "non-threshold" se basan en la hipótesis de "single-hit", y los modelos de "threshold" lo hacen en el concepto de "multi-hit".

A pesar de que los modelos con umbral en la dosis infectiva parten de una base teórica sólida, hasta la fecha todos los esfuerzos por definir las dosis infectiva mínima de algunos microorganismos patógenos ha sido insatisfactorios. En cambio, la teoría de "single-hit", base de los modelos "non-threshold", ha podido ser comprobada experimentalmente a través del estudio de brotes ocasionados por *E. coli* O157:H7,

Salmonella enteritidis, y *Shigella* (Buchanan y col., 2000) donde una sola célula pudo ser causante por sí sola del brote. Este hecho ha puesto en duda la validez de los modelos de umbral de infección y ha relanzado el uso de los modelos de "single-hit" ("non-threshold"). Entre los modelos que no representan umbral, el modelo exponencial es el más extendido gracias a su simplicidad matemática y su excelente ajuste a los datos experimentales. Sobre la función primaria en la ecuación 4.6 aplicamos:

* La hipótesis de "single-hit concept" ($k_{\min} = 1$) e hipótesis de acción independiente.

* d no es un único valor sino que es una distribución de dosis, y esta es la Poisson (el patógeno se distribuye homogéneamente entre raciones).

Así, tras el desarrollo matemático, tenemos que la ecuación exponencial de D-R es:

$$P_i(d) = 1 - \exp(-rd) \quad (4.7)$$

donde r es la probabilidad de que un solo microorganismo produzca infección.

El modelo exponencial puede ser aproximado a uno lineal. Cuando $rd \ll 1$, $\exp(-rd) \sim 1 - rd$, así tenemos que:

$$P_i(d) \sim rd, \text{ para } rd \ll 1 \quad (4.8)$$

El modelo D-R beta-Poisson es un modelo exponencial con el parámetro r variable. Esta variación puede ser debida a la diversidad en la respuesta humana, a la diferente virulencia entre cepas de la misma especie o a ambas. El modelo beta-Poisson describe el parámetro r a través de una distribución beta (Moran, 1954) y asume la acción cooperativa entre microorganismos patógenos (Buchanan y col., 2000), por lo que r es dependiente de la dosis. Dada la complejidad de la función explícita para el modelo beta-Poisson, se ha optado por una aproximación de mayor sencillez, que mostramos a continuación (para más detalle sobre su desarrollo matemático acudir al texto de Haas y col. (1999):

$$P_i(d) = 1 - \left(1 + \frac{d}{\beta}\right)^{-\alpha} \quad (4.9)$$

Los parámetros α y β son derivados del proceso de ajuste matemático. Se debe tener en cuenta que a pequeños valores de β o valores altos de d , la aproximación es menos exacta. Nuevamente esta ecuación puede ser aproximadamente lineal a bajas dosis.

Otros modelos pueden ser derivados de los dos funciones anteriores, modificando el tipo de distribución para las dosis o incluso cambiando la distribución para r (Cassin y col., 1998).

Los modelos de umbral pueden obtenerse a partir de la función exponencial, modificando la hipótesis de partida en cuanto a la dosis mínima infectiva. En el modelo exponencial $k_{\min} = 1$, en cambio, en el modelo de umbral infectivo $k_{\min} > 1$.

Sobre esta base pueden ser generados los modelos de umbral, que son de tipo Gamma, y que en su forma compacta pueden ser definidos como:

$$P_i(d) = \Gamma(k_{\min}, dr) \quad (4.10)$$

Al igual que en los modelos de no umbral infectivo, estos pueden incluir la variabilidad existente en la sensibilidad del hospedador, a través del parámetro r , usando para ello la distribución Beta. También es posible construir modelos de umbral variable donde k_{\min} es una distribución. Ambos tipos de modelos presentan cierta dificultad en su desarrollo matemático. Para un mayor detalle, consultar Haas y col. (1999).

4.5.4. Modelos de recontaminación y/o contaminación cruzada

Aunque los fenómenos de contaminación cruzada y recontaminación han sido siempre entendidos como una causa importante de contaminación de alimentos, sólo en los últimos años, ha surgido un interés especial en estudiarlos en mayor profundidad. La revisión de Reij y col. (2004) incide especialmente en este aspecto e indica la importancia de la información epidemiológica para poder identificar rutas y factores de riesgo asociados a la contaminación cruzada. También se destaca la importancia de incluir estos fenómenos en modelos de ECRM y estudiar así su impacto sobre el riesgo final (den Aantrekker y col., 2003; Reij y col. 2004). Sin embargo, la bibliografía consultada es escasa, y aún carece de una visión unificada en cuanto al modo de modelar los fenómenos de contaminación cruzada y de incluirlos en un contexto de ECRM (Schaffner, 2004).

Los escasos modelos que se encuentran en la bibliografía se basan en la aplicación de tasas de transferencia (TR), o lo que es lo mismo, en porcentajes que describen la proporción de bacterias que pasan de una superficie contaminada a otra debido al contacto entre ellas (Zhao y col., 1998):

$$TR (\%) = \frac{\text{ufc en la superficie donadora}}{\text{ufc en la superficie receptora}} \times 100 \quad (4.11)$$

Con el objetivo de generar datos de TRs para su inclusión en estudios de ECRM, un trabajo previo fue realizado en colaboración con el centro nacional de seguridad y toxicología de los Estados Unidos (NFSTC), en el cual se investigó la transferencia de *L. monocytogenes* durante el loncheado de productos cárnicos cocidos, obteniéndose datos de TR que describen el grado de transferencia de este patógeno entre la loncheadora y el producto en ambos sentidos durante un proceso normal de loncheado (Vorst y col., 2004). También en este trabajo se exploran diferentes alternativas para modelar el conjunto de datos obtenidos y poder así incluirlo en un estudio de ECRM.

La contaminación cruzada cubre un más amplio conjunto de situaciones como la transferencia a través de líquidos o aire. En estos casos, la complejidad matemática es más elevada, aunque también se emplea TR con ciertas modificaciones sobre las unidades (volumen aire y líquido) (den Aantrekker y col., 2003).

4.6. La validación: Un paso necesario en la aplicación de modelos

La validación es un elemento esencial en el proceso de modelado. Un modelo no puede ser aplicado si no ha sido validado previamente, y esto ocurre cuando la predicciones están confirmadas experimentalmente, o estadísticamente, o por algún otro método cuantitativo (Dym, 2004).

Cualquier modelo, independientemente de su naturaleza debe ser sometido a un proceso de validación. El proceso de validación puede ser referido a cuatro importantes aspectos importantes:

- Validación conceptual: Se evalúa si el modelo representa razonablemente el sistema en estudio.
- Validación de algoritmos: Se evalúa si las funciones matemáticas representan el modelo conceptual
- Validación del código del programa informático (verificación): Comprueba si los algoritmos o funciones matemáticas han sido implementadas correctamente
- Validación funcional: Se evalúa si el modelo simula el sistema en estudio, o lo que es lo mismo, la semejanza de los resultados del modelo a las observaciones del sistema estudiado.

En “Microbiología Predictiva”, la validación funcional ha tenido un gran desarrollo. Prácticamente, la mayoría de modelos en la literatura científica presenta, paralelamente al desarrollo del modelo, un proceso de validación. Además, los libros sobre esta área tratan con gran profundidad y claridad la forma de abordar un proceso de validación de manera óptima y eficiente (McKellar y Lu, 2004; Legan y col., 2002).

En “Microbiología Predictiva”, el análisis experimental del crecimiento de un microorganismo en el alimento es la base para la validación del modelo (“challenge tests”). Los datos experimentales de crecimiento son comparados con las predicciones del modelo. Este proceso se denomina validación externa en el alimento para distinguirlo de otros tipos de validaciones, como la validación matemática o la validación a través de datos procedentes de la literatura científica. La validación matemática es previa a la validación en el alimento, y su objetivo es estimar la bondad de interpolación del modelo. La validación con datos de la literatura científica tiene el mismo propósito que la validación en alimento pero empleando datos de otros autores. Este último método es el más extendido dada la facilidad con la que actualmente se puede acceder a una gran cantidad y diversidad de información. Un ejemplo es la conocida base de datos ComBase (Baranyi y Tamplin, 2004) que proporciona una valiosa información en cuanto a los parámetros de crecimiento (tasa de crecimiento, lag, DMP) para distintos microorganismos y factores ambientales.

Para facilitar esta comparación se ha propuesto una amplia variedad de índices estadísticos, entre los más extendidos se encuentran el factor de exactitud, Af (“accuracy factor”) y el factor sesgo, representado por Bf (“bias factor”) (Ross, 1996). El primero nos indica el grado de confianza con el que se puede usar el modelo, esto

es, su exactitud, mientras que el segundo nos indica si las predicciones se encuentran por encima o por debajo de los valores observados. La representación gráfica de los valores observados frente a las predicciones correspondientes también proporcionan una buena idea de la bondad predictiva del modelo, y si estas predicciones sobreestiman o subestiman el crecimiento. El error cuadrático medio (MSE) es un buen indicador de la bondad predictiva de un modelo. Es frecuente encontrar todos estos índices, junto a la representación gráfica en un mismo proceso de validación. El empleo de varios índices a la vez permite obtener un mayor conocimiento de la capacidad predictiva del modelo (te Giffel y Zwietering, 1999).

En el caso de los modelos de D-R, toda la información disponible se suele emplear en el propio desarrollo del modelo, de modo que raramente encontramos datos para el proceso de validación. Sin embargo, cuando se proporcionan nuevos datos, la fiabilidad de las predicciones y la idoneidad de las asunciones en el modelado puede ser evaluadas comparando las predicciones del modelo con los nuevos datos, lo cuales no han debido ser usados para el modelo (Dennis y col., 2002; FAO/WHO, 2003). Un ejemplo podría ser comparar los resultados de un modelo de D-R derivado de estudios hechos sobre ratones con la información bien detallada de uno o varios brote(s) en humanos. Para obtener una información más práctica sobre los procesos de validación en un modelo D-R, consultar Haas y col. (1999) y McCullagh y Nelder (1989). También los modelos de contaminación cruzada pueden ser validados comparando la transferencia obtenida después de aplicar el modelo (ratio de transferencia) a los valores observados experimentalmente con condiciones similares a las que describe el modelo.

Un modelo de ECRM es también un modelo matemático y como tal debe ser validado en su conjunto. Nuevamente, el método se basa en la comparación de valores del modelo con valores obtenidos de la observación del sistema real. Por ejemplo, en el caso de la EE, se pueden comparar valores de concentración y prevalencia predichos con datos obtenidos a partir de estudios prospectivos llevados a cabo por empresas, instituciones estatales, asociaciones sectoriales, etc. Sin embargo, cuando no hay información cuantitativa para comparar, debemos centrarnos más en la validación conceptual, estudiando los límites de aplicación del modelo y la robustez de ciertas aproximaciones. En este mismo sentido, Voysey y col. (2002) afirman que es esencial asegurar que los resultados de la evaluación de riesgo sean acordes con el sentido común y la experiencia.

Hasta la fecha, pocos son los estudios de ECRM que han incorporado un paso de validación. La dificultad para encontrar información cuantitativa, y la falta de procedimientos matemáticos pueden ser las razones de tal carencia. Entre los estudios que llevaron a cabo una validación podemos citar el trabajo conducido por Giovannini y col. (2004), en donde se utilizaron datos obtenidos de entrevistas por teléfono para validar una ECRM de *Salmonella* spp. para consumidores de productos cárnicos de cerdo en una región de Italia. Los datos de las entrevistas fueron transformados por un modelo bayesiano de segundo orden a valores de incidencia de brotes diarreicos debidos al patógeno. Los valores de incidencia del modelo de ECRM (13,7%) y los datos para validación expresados como intervalos de confianza fueron comparados, encontrándose una buena concordancia entre ambos. En esta

aproximación se echa en falta el empleo de técnicas estadísticas que permitan demostrar matemáticamente que las diferencias entre resultados del modelo y validación no fueron realmente significativas. Por otro lado, en el estudio de Rosenquist y col. (2003) se comparó el número de casos de listeriosis obtenidos por el modelo con el número de casos observados en el año 2000, encontrándose una buena concordancia entre ambos. Como en el caso anterior, el criterio utilizado para decidir sobre la validez se basó más en un aspecto meramente personal y subjetivo, que en un análisis estadístico, el cual proporcionaría una mayor fiabilidad a la validación.

En otros casos, cuando no existen datos con los que validar, los procesos de revisión realizados por otros asesores o científicos ajenos a la evaluación pueden ser una buena herramienta para comprobar y determinar si las asunciones, aproximaciones, y límites del modelo son adecuadas para dicho propósito (Voysey y col., 2002). Un claro ejemplo de esto es la ECRM conducida por la FDA/USDA (2003) para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, donde existe un excelso proceso de revisión, que sirve como un proceso de validación.

También, la separación entre variabilidad e incertidumbre, en los modelos de segundo orden, puede ser utilizado para validar. El modo en que la incertidumbre afecta a los resultados del modelo determina la validez de los resultados.

Como resumen de todo lo dicho, y generalizando a todo tipo de modelos, podemos decir que los modelos son incompletas representaciones de la realidad (European Commission, 2003). Pero aún así, los modelos pueden ser útiles a nuestros propósitos. Aproximaciones cuantitativas o cualitativas pueden ser empleadas con el objetivo de conocer la validez del modelo, dependiendo de la disponibilidad o no de datos, respectivamente. Al final, lo importante, independientemente del enfoque tomado para la validación, es que el modelo y su simulación sean el medio más o menos exacto a través del cual el gestor del riesgo pueda establecer políticas y tomar decisiones que sean efectivas en la reducción del riesgo.

5. Tratamiento de los datos en la ECRM y su incorporación mediante distribuciones de probabilidad

5.1. Fuentes de información para la ECRM

La información utilizada para la construcción de modelos de ECRM puede obtenerse a partir de diferentes fuentes:

- Experimentación: Información numérica obtenida a través de experimentación en laboratorio
- Datos de campo: Información numérica procedente de estudios prospectivos
- Información general: Conocimientos generales y básicos sobre diferentes fases y procesos alimentarios. Puede ser de tipo información numérico o cualitativo.
- Opinión de expertos: Información cualitativa que puede ser transformada a términos numéricos.

El primer problema al que se enfrenta un asesor cuando empieza a desarrollar una ECRM es la recopilación de información y datos. Actualmente, con el gran desarrollo de las tecnologías de la información, especialmente, el desarrollo de la red Internet y bases de datos, cualquier tipo de información, por difícil o específica que parezca, puede ser consultada (ver Tabla 5.1). La mayoría de las publicaciones científicas son accesibles a través de Internet; además, instituciones y organizaciones públicas, y también privadas, proporcionan información de interés general (consultas de expertos, estudios prospectivos, etc.).

Las bases de datos, por sus características, pueden ser la mejor fuente de información para el asesor. La información diseminada de cualquier temática, origen y formato puede ser reunida en un espacio virtual con gran facilidad, y puesta a disposición para su consulta en cualquier momento y desde cualquier lugar. Bases de datos como la diseñada por el instituto IFR (Institute of Food Research) y USDA, denominada ComBase, reúne y proporciona una rica y valiosa cantidad de información sobre el crecimiento y muerte microbiana: parámetros cinéticos, curvas, y datos crudos, proporcionados a través de un interfaz fácil y accesible gratuitamente a través de Internet <<http://wyndmoor.arserrc.gov/combase/>>.

También, Health Canadá esta desarrollando un sistema de vigilancia de salud pública, con una infraestructura basada en Internet. El objetivo global del proyecto es promocionar y proteger la salud de la población canadiense y ayudar en el desarrollo de la ER. Entre las diferentes partes que conformarán este proyecto, se encuentra el "Canadian Integrated Public Health System" (CIPHS) que proporcionará un modo estandarizado de unir información desde distintos orígenes, como laboratorios de salud, unidades de salud pública, centros de tratamiento etc. El "Global Public Health Intelligence Network" (GPHIN) es otra parte del sistema que se encargará de

monitorizar y recopilar información para una vigilancia global, creando una base de datos de información internacional de ER.

Tabla 5.1. Ejemplos de direcciones web que proporcionan información útil para el desarrollo de una ECRM.

Dirección Web	Descripción
www.cfsan.fda.gov	Base de información de FDA: documentos de Evaluación del Riesgos, brotes recientes, guías, enlaces a otras fuentes.
www.foodsafety.gov	Información básica y actualidad sobre seguridad alimentaria
www.fsis.usda.gov	Información sobre seguridad alimentaria; documentos de Evaluación del Riesgo
www.foodrisk.org	Recopilación sobre estudios de Análisis de Riesgos en alimentos
www.who.int/foodsafety/micro/riskanalysis/en/	Sección de Análisis de Riesgos de FAO; informes y estudios FAO de Evaluación de Riesgos
www.sra.org	Sociedad de análisis de riesgos (información general): base metodológica
www.riskworld.com/Profsoci/ps5me002.htm	Resumen e informes de análisis de riesgos en general: base metodológica; lista de recursos en Internet
europe.ilsi.org/activities/taskforces/riskassessment/RiskAnalysisMicrobiology.htm	Estudios de Evaluación de Riesgo en Europa
www.cost920.com	Recopilación de estudios de Evaluación del Riesgo en Europa
http://www.iifsan.umd.edu/	Centro dedicado a la investigación y la educación en Seguridad alimentaria: Evaluación del riesgo en alimentos, etc.
http://www.eu-rain.com/	Base de datos europea: información y datos para Evaluación del Riesgo

El establecimiento de sistemas de recopilación de datos es un elemento clave para mejorar la disponibilidad de información a asesores y otros agentes en la cadena alimentaria. No solo basta con diseñar una base de datos, sino que además, debemos crear medios y procedimientos para mantenerla renovada y actualizada en la medida de lo posible. La UE es también consciente de esta problemática. Así, como un primer paso, la Directiva 03/99/EC, sobre monitorización de zoonosis y agentes zoonóticos (EU, 2003) establece que EFSA será la responsable de examinar

y recopilar datos de todos los países miembros y publicarlos a través de informes técnicos (Cavitte, 2004) En la directiva se propone reformar el anterior sistema de información por uno basado en la plataforma Internet (Figura 5.1) (Hugas y Makela, 2004).

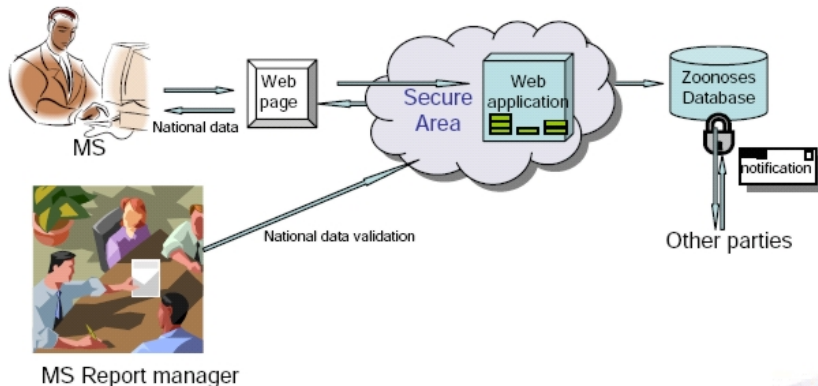


Figura 5.1. Esquema de funcionamiento de la EFSA para la recopilación y creación de base de datos sobre zoonosis y agentes zoonóticos (Cavitte, 2004).

5.2. Calidad de los datos en la ECRM

A la hora de seleccionar la información que será utilizada en la ECRM, formando parte de alguno de los modelos o definiendo algún “input”, tienen prioridad los datos de mayor calidad. Para una selección óptima de la información debemos considerar diferentes aspectos (Wooldrigde, 2002):

- Información completa, detallada y clara
- Información relevante para nuestro problema.
- Inclusión de referencias, fuentes datos utilizados, instituto o centro de donde se deriva, etc.
- Datos crudos accesibles, especificación de unidades, especificación de la variabilidad e incertidumbre de los datos.
- Detalles sobre el diseño experimental (numero de muestras, método de muestreo, etc.) y método microbiológico (sensibilidad, reproducibilidad, precisión, cepas y microorganismos usados)
- Datos homogéneos (estandarizados): Alta comparabilidad entre ellos.

En algunos casos, el tipo de información, y el formato en que se presenta, no es el más adecuado para su utilización en una ECRM. Por ejemplo, cuando un estudio de enumeración y prevalencia presenta su información en tablas, estas pueden dar

los valores de concentración por muestra, o por el contrario, clasificar las muestras en rangos o intervalos de concentración (información semicuantitativa). Este último formato puede ser consecuencia de una metodología poca precisa y/o limitada que no permite más resolución en los resultados. Sin embargo, en otros casos, es un modo de reducir la complejidad en la presentación de los datos y hacerlos más claros y comprensibles para el lector, aunque al mismo tiempo puede hacer nuestro modelo más incierto y menos preciso. Por ejemplo, la Tabla 5.2 presenta las concentraciones analizadas para un patógeno X, en un producto Y, expresadas en intervalos de concentración:

Tabla 5.2. Concentración del patógeno X (ufc/g).

Concentración (ufc/g)	Numero de muestras (n)*
< 0,04	22
0,04-1	5
1-10	2
10-100	0
100-1000	1
Total	30

*Fueron analizados 25 gramos por cada muestra.

La muestra que se encuentra en el rango 100-1000 ufc/g podría ser determinante en términos de riesgo. Para aclararlo usaremos un modelo D-R para el patógeno X, el cual podría ser $P=r \cdot d$ (ver sección anterior), donde P es la probabilidad de infección, $d=25$ g es la dosis ingerida y $r=0,0005$ es una constante para el patógeno X (probabilidad de infección por célula ingerida). Para calcular el riesgo asociado a esta muestra aplicamos los extremos de concentración del intervalo 100 - 1000 ufc/g como posibles valores reales, obteniéndose, para el primero un valor de $P = 0,05$ y $P = 0,5$ para el segundo. Es decir, dentro del mismo intervalo se podrían registrar probabilidades de infección de 5:100 a 50:100 individuos. Este ejemplo pone de manifiesto que información poco precisa en los datos conduce a una estimación del riesgo más incierta.

La ER es el elemento que el gestor del riesgo tiene que utilizar para decidir. Por tanto, desde un punto de vista práctico, el proceso de ER debe proseguir utilizando para ello todos los datos necesarios aunque, en algunos casos, estos sean incompletos o deficientes. Posteriormente, si fuese disponible nueva información, el modelo podría ser mejorado incorporando la dicha información.

Numerosas herramientas estadísticas están a nuestra disposición para tratar datos deficientes e incompletos de la manera más óptima en una ECRM como puso de manifiesto el trabajo de Pérez-Rodríguez (2004).

Por otro lado, durante el desarrollo de una ECRM, el asesor puede encontrarse sin modelos adecuados para describir alguna de las fases o procesos. Esto es bastante frecuente cuando se quiere incluir un modelo de recontaminación o contaminación cruzada en una EE. Actualmente, la cantidad de modelos que describen el fenómeno de transferencia son escasos y sólo consideran un reducido grupo de microorganismos patógenos. En estos casos, el asesor está obligado a realizar extrapolaciones y aproximaciones con otros modelos, si quiere incluir esta

parte en la evaluación. La validación del modelo debe intentar basarse en una validación funcional usando datos bibliográficos. Sin embargo, si esto no es posible (ya que a veces puede no existir información disponible), debemos i) analizar si la incorporación del modelo puede ser útil para nuestro propósito, y ii) si la aproximación o extrapolación es razonable (confirmación del modelo). Aunque no es propiamente una validación según lo explicado en un apartado anterior; es también cierto, que el propósito de un modelo ECRM es servir como herramienta para que los gestores del riesgo puedan emitir juicios y decisiones efectivas y coherentes con la situación. La inclusión de un modelo, si es útil, puede ser considerada aceptable.

5.3. Definiendo las variables de un modelo de ECRM

Las variables que describen cada modelo matemático pueden ser definidas por valores puntuales o distribución de probabilidad, dando lugar a los mencionados modelos “deterministas” o “probabilísticos”, respectivamente. En el primer caso, se pueden obtener valores medios de un grupo de datos experimentales, o simplemente proporcionar el valor a través de un juicio u opinión de expertos. En el caso de un modelo “probabilístico”, las variables son distribuciones de probabilidad que pueden ser generadas desde datos experimentales o, nuevamente, desde una opinión de expertos. Los datos experimentales son utilizados para ajustar matemáticamente una distribución de probabilidad, representada matemáticamente como una función de probabilidad. Evidentemente, un mayor número de datos posibilita una mejor inferencia sobre la variable. El siguiente ejemplo ilustra cómo ambos aspectos pueden ser abordados en la práctica:

En un proceso de almacenamiento de un alimento, donde se produce crecimiento del patógeno X, las variables temperatura (T) y tiempo (t) son las más determinantes en el crecimiento. Por lo que, en este caso, el crecimiento puede ser estimado aplicando la ecuación 5.1:

$$\log(N_t) = \log(N_i) + K(T) \cdot t \quad (5.1)$$

donde, N_t : Concentración final de células (log ufc/g)

N_i : Concentración inicial de células (log ufc/g)

t : Tiempo de almacenamiento (d)

$K(T)$: Tasa máxima de crecimiento, dependiente de la temperatura (T) (d^{-1})

Para describir las variables de la ecuación 5.1, se utilizan datos tomados de observaciones directas en equipos de refrigeración (Tabla 5.3)

En un enfoque “determinista”, los datos son utilizados para calcular las medias de la T y t (Tabla 5.3), y aplicadas como valores puntuales en la ecuación 5.1:

$$\log(N_t) = 1 + 0,8 \cdot 2,5 = 3 \text{ log ufc/g}$$

$$(\log(N_i) = 1 \text{ log ufc/g})$$

Tabla 5.3 *Temperaturas observadas en diferentes refrigeradores domésticos.*

<u>Refrigerador</u>	<u>T (°C)</u>	<u>t (día)</u>	<u>K (log ufc/día)</u>
A	10,0	1,0	1,4
B	7,0	2,0	0,8
C	6,25	2,5	0,7
D	5,2	3,0	0,4
F	7,3	3,6	0,9
G	6,3	2,6	0,7
Media	7,2	2,5	0,8

Para el caso probabilístico, las distribuciones que describen las variables T y t se pueden estimar mediante diferentes métodos estadísticos de ajuste, tales como método de momentos, función de máxima probabilidad, etc. Como resultado del proceso se eligen las distribuciones que mejor se ajusten a los datos, utilizando para ello diferentes estadísticos de bondad de ajuste. Al margen del aspecto puramente estadístico, se debe comprobar que no existan contradicciones entre las características de la distribución elegida y la variable que va a representar. Por ejemplo, la distribución Normal es una distribución con dominio $(-\infty, +\infty)$, y por tanto, no podría ser utilizada como tal para representar la variable t , a pesar de un hipotético buen ajuste, ya que t , el tiempo, no puede ser negativo.

Cuando para una misma variable tenemos varios grupos de datos, estos pueden ser empleados conjuntamente a través de diferentes técnicas estadísticas para ser ajustados a una sola distribución; o por el contrario, pueden ser utilizados separadamente, definiendo escenarios específicos en el modelo, con diferentes "outputs", según el grupo de datos utilizado. En el caso de usarse conjuntamente, podemos aplicar un proceso de ponderación o "pesado" estadístico de los datos en función de ciertas características (país, antigüedad, número de muestras, etc.) (Pérez-Rodríguez, 2004). Así, durante la simulación, serán muestreados con mayor frecuencia (mayor número de iteraciones) aquellos que tenga un mayor "peso" estadístico (Wooldridge, 2002).

En aquellos casos donde la información es escasa o simplemente no existen se acude al juicio u opinión de expertos. Para modelos "probabilísticos", el experto, en función de sus conocimientos sobre la variable, proporciona los parámetros necesarios para describir la función de probabilidad (paramétrica) que más se adecue a las características y propiedades de la variable. Para ello, los expertos deben poseer una base sólida de conocimientos de estadística y distribuciones de probabilidad. En algunos casos se ha propuesto un procedimiento normalizado para definir las distribuciones desde un panel de expertos apoyándose en técnicas "probabilísticas". Así, cada experto del panel propone los parámetros para la distribución. Posteriormente, estas distribuciones son simuladas conjuntamente para dar lugar a una única distribución que describirá la(s) variable(s) en cuestión en el

modelo de ECRM. Además, a cada distribución se le asigna un “peso” estadístico en función del grado de conocimientos que cada experto posee sobre la variable en cuestión. Para este procedimiento, se usa un tipo de distribución paramétrica, denominada BetaPert, la cual puede ser definida mediante tres parámetros de fácil interpretación, como son valor máximo y mínimo y valor más probable (Vose, 2000a).

5.4. Distribuciones de probabilidad

Una distribución de probabilidad es una función de la probabilidad $F(x)$ que representa una variable aleatoria X .

$$F(x) = P(X \leq x) \quad (5.2)$$

A $F(x)$ se le denomina función de distribución de probabilidad de la variable X y representa la probabilidad de que la variable tome un valor desde $-\infty$ hasta x . También se la denomina función de probabilidad acumulada.

Asimismo, las distribuciones se dividen en discretas y continuas en función del conjunto de valores que puede tomar la variable X .

1) Las distribuciones de variables discretas, se componen de un conjunto de valores definidos, donde cada uno de los cuales tiene una probabilidad de ocurrencia. Ejemplos de estas son la distribución Binomial, Poisson, Geométrica, Hipergeométrica, Binomial y Poisson negativa, y Discreta. En este caso, la función de probabilidad acumulada se define como:

$$F(x) = \sum_{i=1}^N P(x_i) \quad (5.3)$$

2) Las distribuciones de variables continuas son aquellas que pueden tomar cualquier valor dentro de un rango definido. Estas son la distribución Normal, Lognormal, Exponencial, Gamma, Beta, Weibull, etc. La derivada de la función de probabilidad da lugar a la función de densidad de probabilidad, $f(x)$ que es el ratio de cambio de la función de probabilidad acumulada:

$$f(x) = \frac{d}{dx} F(x) \quad (5.4)$$

Las distribuciones de probabilidad pueden ser, a su vez, paramétricas o no paramétricas:

1) El primer término hace referencia a funciones de probabilidad ya establecidas, y definidas por un número limitado de parámetros, que se basan en el desarrollo teórico de un problema matemático. Las más conocidas son la distribución normal, exponencial, gamma, beta, binomial y Poisson.

2) En cambio, las distribuciones no paramétricas son funciones empíricas cuyo número de parámetros es proporcional al grado de ajuste a los datos (mayor número de parámetros, mejor ajuste), y por tanto no se derivan de un problema matemático. Las distribuciones no paramétricas son más flexibles y se adaptan mejor a un

conjunto de datos, pero sin embargo, no tienen una base teórica matemática que permita una aplicación más fundamentada.

5.4.1. Distribuciones continuas

Distribución lognormal

El dominio de la función corresponde sólo a valores positivos. Describe variables aleatorias que resultan de procesos multiplicativos, y es un buen descriptor de concentraciones como resultado de procesos de dilución en aire y agua. Además, ha sido usada para modelar longitud de palabras y sentencias, tamaños de partículas en agregados, dosis críticas en farmacia y periodos de incubación de enfermedades. Finalmente, la distribución lognormal se usa también para representar valores de incertidumbre con asimetría, dado la pronunciada desviación que presenta en su cola derecha (Olkin y col., 1980).

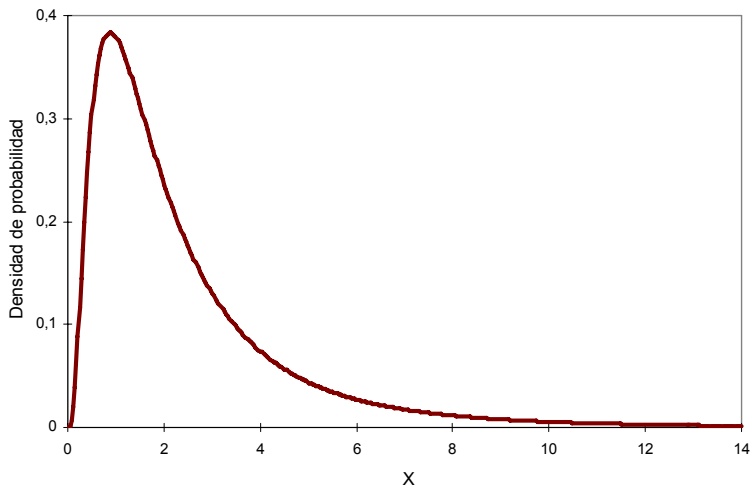


Figura 5.2. Ejemplo de la distribución lognormal.

Los parámetros que definen una distribución lognormal son m ($m = \exp(\mu_{\ln(x)})$) y σ (la desviación estándar de $\ln(x)$, o también llamado el parámetro de la forma. La función de densidad de probabilidad es:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma x} \exp\left[-\frac{[\ln(x) - \ln(m)]^2}{2\sigma^2}\right], \text{ para } 0 \leq x < \infty \quad (5.5)$$

Distribución normal

La distribución normal se origina a partir del Teorema Central del Límite (TCL). Este teorema afirma que la distribución de medias de observaciones independientes converge hacia una distribución normal a medida que el número de observaciones

se hace mayor. Otra afirmación del teorema es que, independientemente de su forma o tipo, para muestras que se originen a partir de un importante número de distribuciones, su suma se aproxima a una distribución normal a medida que el número de distribuciones aumenta. De modo que cuando se supone que una variable es el resultado de un conjunto grande de causas independientes, el TCL conduce a que esta variable sea una distribución normal.

Esta distribución está unida desde un punto de vista teórico con la distribución lognormal. Esta es también una distribución derivada del TCL, aunque para el caso de un proceso multiplicativo, y no sumatorio, como indicábamos en un párrafo anterior para la distribución normal. Así, cuando el logaritmo natural de la variable es distribuido como una distribución normal, esta variable se distribuye como una lognormal. De hecho en muchas ocasiones la distribución normal se define mediante los parámetros de la lognormal.

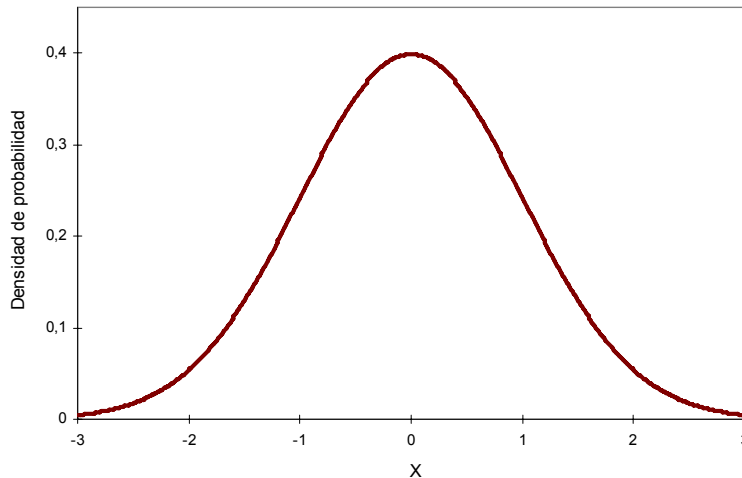


Figura 5.3. Ejemplo de la distribución normal.

El dominio de esta función se corresponde con el conjunto de números reales. Evidencias experimentales sugieren que la distribución normal puede representar bien algunos procesos físicos y características fisiológicas.

La función de densidad de probabilidad para la distribución normal es:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right], \text{ para } -\infty \leq x \leq \infty \quad (5.6)$$

Los parámetros σ (media) y μ (desviación estándar) definen esta distribución.

Distribución acumulativa

Esta distribución se utiliza con frecuencia para modelar datos procedentes de opiniones de expertos. En otros casos, también se puede usar para simplemente

convertir un grupo de datos experimentales en una distribución. La distribución es una sucesión de representaciones de incrementos lineales y rectilíneos entre los valores y sus probabilidades, $(x_i, P_i) : (x_{i+1}, P_{i+1})$; y estos mismos valores son los parámetros que la definen. La forma de la distribución no es muy natural (Figura 5.4) si la comparamos con otras, aunque puede ser muy útil si se desconoce de que manera se distribuyen los datos.

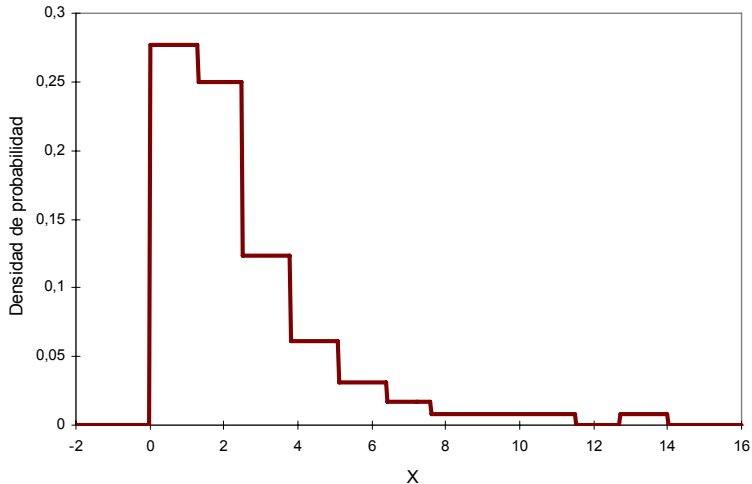


Figura 5.4. Ejemplo de la distribución acumulativa.

La función de la probabilidad acumulativa corresponde a la siguiente expresión:

$$F(x) = \sum_{j=1}^i p_j \text{ si } x_j \leq x < x_{j+1}, \text{ suponiendo que } x_j \text{ estan en orden ascendente} \quad (5.7)$$

Distribución uniforme

La distribución uniforme es un caso especial de la distribución beta. Es una distribución que suele emplearse para describir variables con pocos datos o cuando estos son inexistentes. También se puede aplicar para modelar opiniones de expertos sobre la incertidumbre de un parámetro. Si bien, la caída abrupta de probabilidad hasta 0 en el mínimo y máximo de la distribución no la hace la más adecuada para este propósito. Como se puede observar en la Figura 5.5, este tipo de distribución tiene una forma en línea recta.

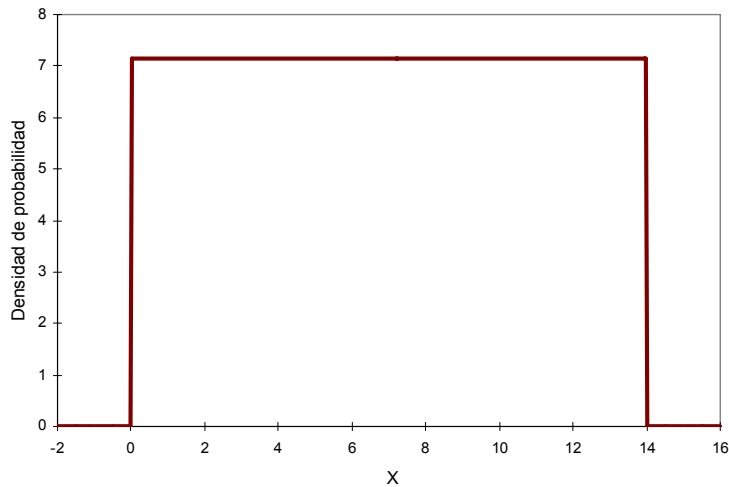


Figura 5.5. Ejemplo de la distribución uniforme.

La función de densidad de probabilidad corresponde a:

$$f(x) = \frac{1}{\max - \min} \quad (5.8)$$

Y la función de probabilidad acumulada:

$$f(x) = \frac{1 - \min}{\max - \min} \quad (5.9)$$

Los parámetros que definen este tipo de distribución corresponden a los valores máximo y mínimo de la variable.

Distribución triangular

La distribución triangular es otra distribución que no presenta formas naturales (Figura 5.6), y que no tiene una base teórica. Sin embargo, descrita a través de tres parámetros, posibilita el modelado aproximado de un conjunto de datos, con un grado de flexibilidad considerable. Por esta razón, se usa ampliamente en evaluación del riesgo para modelar conjuntos con pocos datos y la opinión de expertos. Los parámetros son los valores mínimo, máximo y más probable del conjunto de datos. Aunque no es una distribución muy común en estadística clásica, suele ser incluida en los programas informáticos de simulación (por ej., @Risk Palisade®).

La función de densidad de probabilidad es:

$$f(x) = \frac{2(x - a)}{(b - a)(c - a)} \quad \text{si } a \leq x \leq b \quad (5.10)$$

$$f(x) = \frac{2(c - x)}{(c - a)(c - b)} \quad \text{si } b \leq x \leq c \quad (5.11)$$

donde a = valor mínimo, b = valor más probable y c = valor máximo.

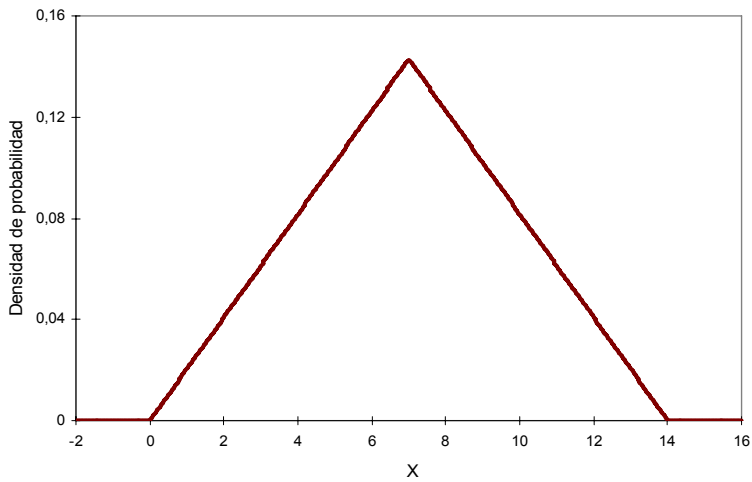


Figura 5.6. Ejemplo de la distribución triangular.

Distribución exponencial

La distribución exponencial se utiliza para representar intervalos de tiempo entre eventos sucesivos, aleatorios, e independientes que ocurren a un ratio constante. Por ello, la distribución exponencial se asocia a procesos de Poisson. Ejemplos de esto son el tiempo que tarda una bombilla en fallar, o el que un estudiante emplea en realizar un examen. La ingeniería la aplica en el cálculo del tiempo que transcurre entre sucesivos fallos de componentes en una máquina compleja. Las empresas de telefonía la utilizan en la estimación del tiempo de duración de llamadas.

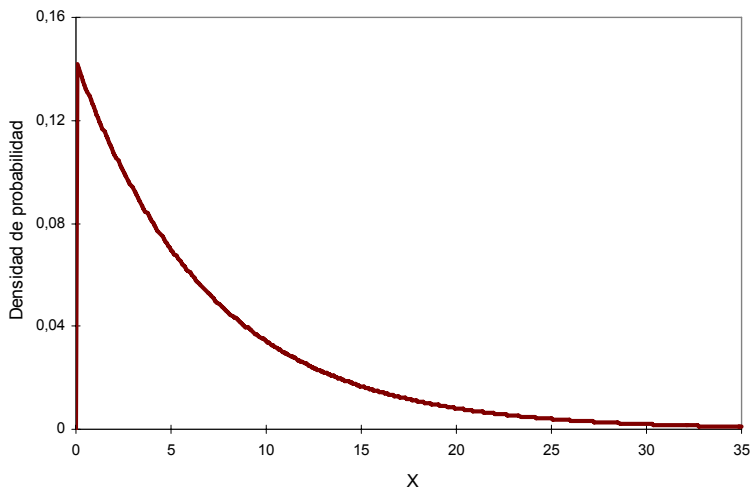


Figura 5.7. Ejemplo de la distribución exponencial.

La función de densidad de probabilidad es:

$$f(x) = \lambda \exp(-\lambda x), \text{ para } 0 \leq x < \infty \quad (5.12)$$

La función de probabilidad acumulada:

$$F(x) = 1 - \exp(-x\lambda) \quad (5.13)$$

Donde, λ el parámetro de la distribución, es igual al ratio medio de ocurrencia de un evento. Algunos ejemplos adicionales del empleo de la exponencial, son el su uso para representar la concentración de plomo en el aire o la prevalencia de microorganismos en productos alimenticios.

Distribución gamma

Esta distribución pertenece a la familia de distribuciones exponenciales. La distribución gamma (α , β) describe el tiempo transcurrido antes de que un determinado número (α) de eventos ocurra según un proceso de Poisson, y a un ratio medio constante (β). La diferencia con la distribución exponencial radica en que la distribución gamma describe el tiempo para uno o más eventos; sin embargo, la exponencial sólo lo hace para un único evento. De hecho, la distribución gamma se considera una generalización de la exponencial, de tal modo que cuando $\alpha = 1$, tenemos una distribución exponencial (Peebles, 1987).

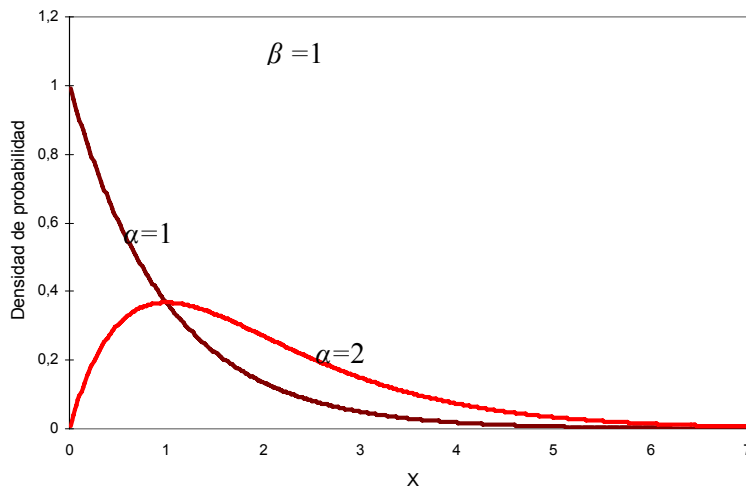


Figura 5.8 Ejemplos de la distribución gamma.

Ejemplos de su uso son la estimación del número de tormentas, duración de estas y el tiempo entre ellas. También se ha aplicado en ECRM para modelar el tiempo de permanencia en refrigeradores domésticos (Nauta, 2001)

La función de densidad de probabilidad es:

$$f(x) = \frac{\beta^{-\alpha} x^{\alpha-1} \exp(-x / \beta)}{\Gamma(\alpha)} \quad (5.14)$$

Distribución beta

Esta distribución posee una gran flexibilidad, con una gran diversidad de formas, que consigue a través de la modificación de sus dos parámetros, a y b (ver Figura 5.9 y 5.10). Dado que su dominio solo comprende un rango 0-1, la distribución es adecuada para representar porcentajes, ratios, proporciones etc. (tiempo, longitud, biodisponibilidad). Además, esta característica posibilita que pueda ser reescalada usando los valores de los límites del nuevo rango. También esta distribución tiene su aplicación en técnicas estadísticas no clásicas, como en la inferencia Bayesiana, donde se usa frecuentemente para representar la incertidumbre sobre el parámetro p de la distribución binomial.

La distribución de densidad de probabilidad es:

$$f(x) = \frac{x^{a-1}(1-x)^{b-1}}{\int_0^1 t^{a-1}(1-t)^{b-1} dt} \quad (5.15)$$

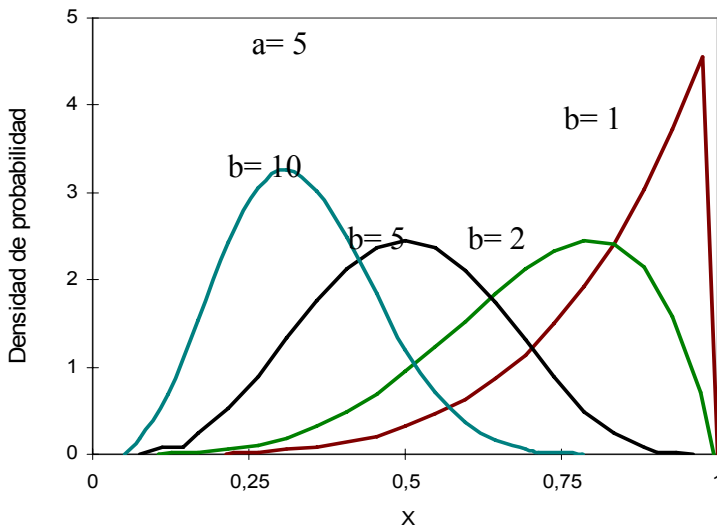


Figura 5.9. Ejemplos de la distribución beta con $a=5$.

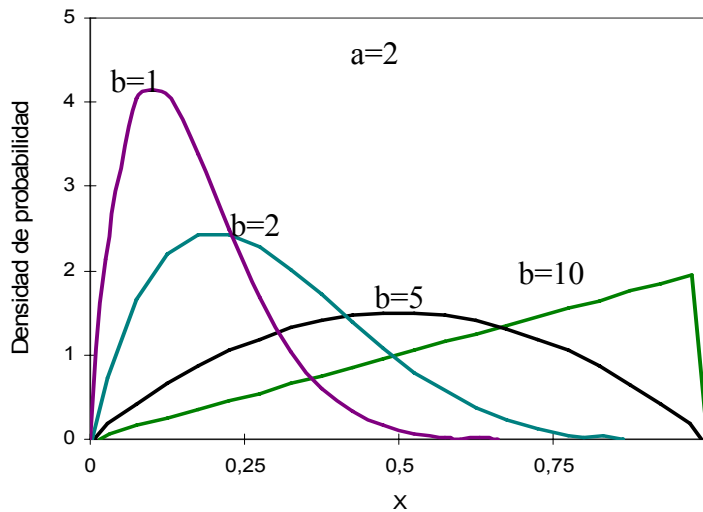


Figura 5.10. Ejemplos de la distribución beta con $a=2$.

Distribución Pert (beta Pert)

Es una variante de la distribución beta usando 4 parámetros: el valor máximo, mínimo, más probable, y medio. Este último puede ser derivado de los tres anteriores mediante la expresión:

$$\text{Media} = \frac{\text{Mínimo} + 4 * \text{Más probable} + \text{Máximo}}{6} \quad (5.16)$$

Esta distribución es idónea para modelar los datos procedentes de opinión de expertos sobre una variable. No es habitual dentro de los compendios de distribuciones pero sí se encuentra en los programas de simulación.

Distribución Weibull

La distribución Weibull se utiliza para representar procesos tales como el tiempo hasta finalización o el tiempo hasta fallo. Esta distribución flexible puede adoptar asimetrías positivas y negativas; en el primer caso, la distribución muestra bastante similitud con la distribución gamma, pero con menos desviación y una cola menos pesada. También la distribución Weibull es una alternativa a la distribución lognormal cuando la cola que presentan es más ligera. Los parámetros α y β definen esta distribución. Cuando el parámetro de forma (α) es igual 1, esta distribución es idéntica a la distribución exponencial. Además, cuando el parámetro $\beta = 3,25$ la distribución es muy parecida a la distribución normal.

Como ejemplos de su aplicación, la distribución ha sido usada para modelar la velocidad del viento o también para modelar el tiempo entre eventos climáticos.

La distribución de densidad de probabilidad es:

$$f(x) = \frac{\alpha}{\beta} \left(\frac{x-L}{\beta} \right)^{\alpha-1} \exp \left\{ - \left(\frac{x-L}{\beta} \right)^\alpha \right\} \text{ para } \alpha, \beta > 0, x \geq L \quad (5.17)$$

(L es el parámetro de localización)

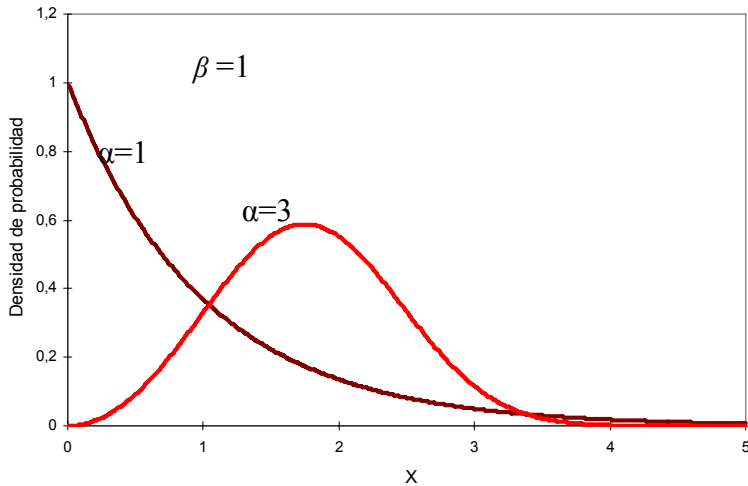


Figura 5.11. Ejemplos de la distribución Weibull

5.4.2. Distribuciones discretas

Distribuciones Bernoulli y binomial

Cuando un experimento aleatorio tiene dos posibles resultados, decimos que es un ensayo de Bernoulli. Por ejemplo, ensayos de Bernoulli pueden ser cuando estamos interesados en si un estudiante aprueba o suspende un examen o en si una persona ha contraído o no una determinada enfermedad. Esta dualidad permite referirnos al resultado como éxito o fracaso, si bien su asignación es arbitraria.

La variable de un ensayo de Bernoulli puede ser definida como sigue: si el resultado es un éxito ω , $X(\omega)=1$; mientras que si el es un fracaso ω , $X(\omega)=0$.

Tabla 5.4. Función de masa de una variable aleatoria de Bernoulli (p es la probabilidad de éxito).

X	0	1
$p_x(x)$	$1-p$	p

Toda variable con esta función de masa (Tabla 5.4) es una variable aleatoria de Bernoulli. Si nosotros hacemos n repeticiones de un ensayo de Bernoulli, podemos considerar una nueva variable $Z = 1, 2, \dots, n$. Por ejemplo, si $n = 3$, los resultados posibles son 8: (E, E, E), (E, E, F), (E, F, E), (F, E, E), (F, F, E), (F, E, F), (E, F, F) (F, F, F). "E" indica éxito y "F" fracaso. Entonces, correspondiendo, respectivamente, con los resultados anteriores tenemos $Z: 3, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 0$. Para calcular la probabilidad total del modelo Z, primero debemos calcular la probabilidad asociada a cada

resultado simple. Puesto que $n = 3$ ensayos son independientes, las probabilidades para los resultados simples pueden se calculan según se muestra en la Tabla 5.5:

Tabla 5.5. Probabilidades simples para el modelo Z con $n= 3$

Z	0	1	2	3
$P\{Z=z\}$	$(1-p)^3$	$3p(1-p)^2$	$3p^2(1-p)$	p^3

La probabilidad asociada a resultados que tienen el mismo valor de Z puede ser calculada multiplicando la probabilidad de uno de ellos por el número total de eventos. Por ejemplo, para $Z = 2$, $\{(E, E, F), (E, F, E), (F, E, E)\}$, todos tienen la misma probabilidad $p^2(1-p)$, valor que se multiplica por $C(3, 2) = 3$, obteniéndose así la probabilidad asociada al resultado simple $Z = 2$. Por tanto, la función de masa de probabilidad, $p_z(k)$, para Z corresponde a la ecuación 5.18:

$$p_z(k) = P\{Z = k\} = \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k}, \quad k = 0, 1, 2, \dots, n. \tag{5.18}$$

donde k es el número de éxitos y n el número total de eventos. Esta ecuación es la función de masa de probabilidad de una distribución binomial. La distribución binomial esta definida por dos parámetros: n el número de ensayos de Bernoulli y p la probabilidad de éxito en cada uno de los ensayos.

La distribución Binomial surge en todo proceso que implica el muestreo aleatorio de un número n de muestras con reemplazamiento. Cada unidad en la población de muestreo es clasificada en una u otra categoría en función de si posee o no una cierta propiedad. Por ejemplo, la unidad puede ser una persona y la propiedad puede ser si va a votar “sí” o si ha sido arrestado alguna vez. Esto aplicado a microbiología alimentaria puede ser si un alimento (unidad) esta contaminado (propiedad). En este último caso, si conocemos la proporción de alimentos contaminados en toda la producción, y tomamos una muestra de esta (Z) entonces Z posee una distribución binomial con los parámetros n y p .

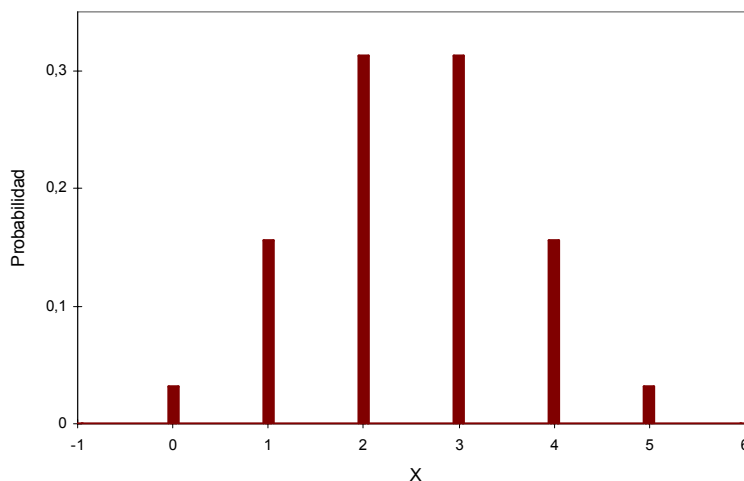


Figura 5.12. Ejemplo de la distribución binomial

La distribución Poisson

Si la concentración de un microorganismo patógeno o compuesto tóxico en una muestra líquida, por ej., de 10 L. es muy baja, o casi cero, y además, esta varía entre diferentes muestras, entonces decimos que sigue un proceso Poisson y pudiendo ser descrito por una distribución Poisson:

$$p_x(K) = P\{X = k\} = \frac{\exp(-\lambda)\lambda^k}{k!}, \quad k = 0, 1, 2, \dots \quad (5.19)$$

donde λ es el parámetro que define la distribución Poisson, y puede ser cualquier valor positivo. Como p para la binomial, λ es una propiedad del sistema físico que describe. Como ya mencionamos previamente, la distribución Poisson se aplica para describir la distribución de microorganismos o tóxicos se distribuyen en grandes extensiones de agua. Generalizando, esta distribución se utiliza en la biología cuando el sistema puede ser dividido en secciones iguales de las cuales se realizan recuentos: glóbulos rojos en sangre, cultivos celulares, etc.

Otra explicación para la distribución Poisson se puede derivar del hecho que describe el número de eventos discretos que ocurren dentro de un intervalo de tiempo fijado. Esta distribución está estrechamente relacionada con la distribución exponencial.

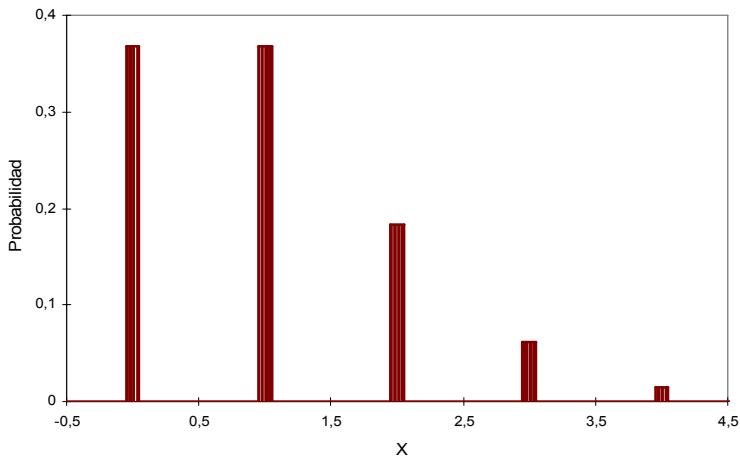


Figura 5.13. Ejemplo de la distribución Poisson

La distribución discreta

Esta función no tiene una base teórica, y no se encuentra como una distribución clásica en los libros de estadística. No obstante, tiene gran aplicación en la evaluación del riesgo, por lo que se incluye en los programas de simulación. Su función de masa de probabilidad es:

$$F(x) = \sum_{j=1}^i p_j \quad \text{si } x_i \leq x \leq x_{i+1} \quad \text{suponiendo que } x_i \text{ esten en orden ascendente} \quad (5.20)$$

Esta distribución es particularmente útil para obtener probabilidades compuestas o para combinar varias distribuciones que han sido derivadas de la opinión de expertos.

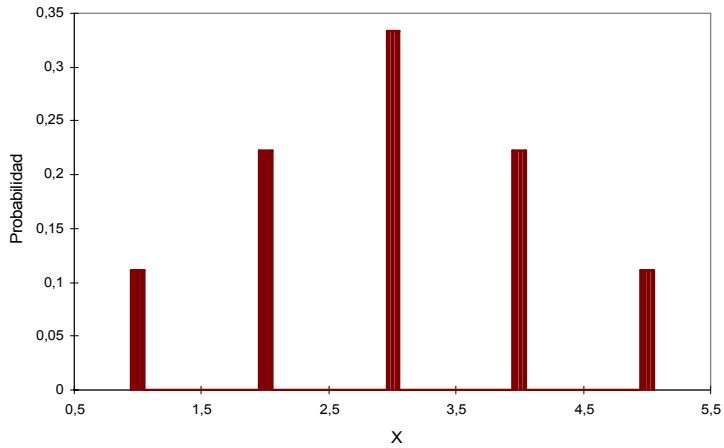


Figura 5.14. Ejemplo de la distribución discreta

6. Análisis de sensibilidad

El término “análisis de sensibilidad” hace referencia a un conjunto de métodos de índole estadístico que se utilizan en el campo de la evaluación del riesgo y en otras áreas afines (por ej., ciencias económicas, matemáticas, ingeniería civil, etc.) para conocer cómo opera un modelo y qué factores en él son los más significativos. Para ello, se realizan cambios sistemáticos en el modelo, y se observa el efecto sobre los resultados (Ragsdale, 2001, Saltelli, 2002).

La construcción de un modelo es un proceso que viene acompañado inevitablemente de multitud de suposiciones e interpretaciones sobre los datos que se manejan. De ahí que ninguna opción tanto estructural, metodológica o de elección de variables pueda ser considerada en términos absolutos, como solución óptima, y raramente única (European Commission, 2003). Esto da lugar a una fuente de incertidumbre constante e inevitable. Por ello, su evaluación y reducción debe entenderse como un paso necesario en el desarrollo y construcción de cualquier tipo de modelo.

Un análisis de sensibilidad ayuda a comprender la influencia de la incertidumbre de nuestro modelo influye sobre el resultado final (“output”). Además, es también una herramienta efectiva para identificar y localizar aquellas carencias más significativas en los datos. A través de su conocimiento, los gestores del riesgo, por ejemplo, pueden asignar de manera más eficiente los recursos necesarios para reducir la incertidumbre.

Muchas veces, el “output” no resulta lo suficientemente explícito o interpretativo. Las representaciones gráficas o el análisis visual puede ser una manera óptima de conseguir una mayor claridad en los resultados. Esto es clave para que los gestores del riesgo puedan interpretar los resultados del modelo de una forma más adecuada (Vose, 2000b).

Por otro lado, si estamos interesados en inferir o en realizar intervenciones reales en base a los resultados, no sería suficiente una simple predicción o estimación, de por ej., el número de enfermos por año, o el número de hospitalizaciones. En todo caso, deberíamos conocer qué variables (“inputs”) son las determinantes en nuestro resultado, y de qué manera deberíamos actuar sobre ellas para conseguir nuestro objetivo en nuestro ámbito evidentemente, la reducción del riesgo microbiano en alimentos.

6.1. Clasificación y tipos de métodos de sensibilidad en modelos de ECRM

Cassin y col. (1998) ya mostraron la conveniencia de realizar cambios sobre el modelo original (riesgo microbiano, MPR) para evaluar posibles estrategias de reducción del riesgo. También, en este mismo trabajo, se realizó lo que llamaron un análisis de importancia, que se basó en la estimación del coeficiente de correlación de *Spearman* entre las variables “input” y “output” del modelo.

Zwietering y van Gerwen (2000) presentaron tres tipos de análisis de sensibilidad enfocados al riesgo microbiano. El primero tiene un carácter “determinista”, y pone de relieve las fases (inactivación, crecimiento, etc.) más significativas en el orden de magnitud del modelo de ECRM. Para ilustrarlo de una manera simple, podemos comparar un tratamiento térmico con un fenómeno de recontaminación. El primero implica una reducción logarítmica de la concentración, en comparación con el segundo que solo lo hace aritméticamente; en consecuencia, el tratamiento térmico podría considerarse más importante que la recontaminación en cuanto al nivel de concentración final del microorganismo resultante de ambos procesos.

El siguiente tipo también recurre al cálculo “determinista”. Este consiste en comparar la estimación a valores conservadores o extremos (“worst-case”) de una variable (“input”) con valores medios de este. Para ello se puede usar la siguiente expresión:

$$\text{Efecto} = N(\text{extremo}) / N(\text{normal}) \quad (6.1)$$

$$\text{Log Efecto} = \log N(\text{extremo}) - \log N(\text{normal}) \quad (6.2)$$

N sería la concentración estimada para cada valor de la variable objeto de estudio (extremo o normal). Cuando la diferencia o cociente es inferior a 1 log, el efecto de la variable puede ser considerado despreciable. Este método también posibilita el estudio de una variable considerando la variación sobre otras. Así, a través de un proceso escalonado pueden identificarse ciertos sinergismos entre variables.

Los métodos, hasta ahora presentados, pueden identificarse como el primer paso en un proceso sistematizado de análisis de sensibilidad. A través de ellos se pueden identificar las fases y procesos más determinantes en un modelo; sin embargo, serán necesarios análisis más exhaustivos que nos indiquen con un mayor detalle las variables más determinantes sobre el riesgo, y en qué medida lo son.

El análisis probabilístico es el último tipo que se propone en el trabajo de van Zwietering y van Gerwen (2000). Este análisis se basa en simular mediante Monte-Carlo u otra técnica similar el modelo con todos los “inputs” en forma de distribución. Las iteraciones generadas son aplicadas para estimar el coeficiente de correlación de *Spearman*, que ya mencionamos para el trabajo de Cassin y col. (1998), y que también suele denominarse coeficiente de regresión o correlación de ranking (Vose, 2000b y Cullen y Frey, 1999). En este caso, el análisis tiene en cuenta la interacción entre las variables fruto del carácter aleatorio de la simulación, con lo que los resultados aquí, proporcionan un mayor grado de información sobre el efecto de las variables en el modelo.

La distinción entre variabilidad e incertidumbre en el modelo (dos dimensiones) puede ayudar a identificar, además, aquellas fuentes de incertidumbre, las cuales se podrían reducir con una investigación más profunda y una mayor disponibilidad de datos. Distinto es el caso de aquellas variables que sólo son determinantes en la variabilidad del modelo, y no en la incertidumbre, ya que su efecto no puede ser

eliminado por ser propio del sistema natural que se está modelando, aunque sí controlado.

Es evidente, por tanto, que combinando un modelo “probabilístico”, con dos dimensiones, y aplicando un análisis de sensibilidad exhaustivo se puede obtener una información valiosa sobre aspectos de funcionamiento, variables determinantes, y error del modelo.

Aunque, la bibliografía no abunda mucho en cómo puede ser abordada una fase de análisis de sensibilidad sobre un modelo de ECRM, sí es cierto que existe un interés creciente en acordar una metodología que se adapte a las características específicas de este tipo de modelos. Es reseñable el interés que ha mostrado Christopher Frey de la universidad de North Carolina (USA). Este investigador ha incidido en que no existe ningún método que por sí solo pueda extraer de una manera óptima y sin errores y suposiciones toda la información contenida en un modelo de ECRM. Es más, este autor destaca que cada método tiene sus ventajas y desventajas, además de su contexto de aplicación, y que, por tanto, solo a través de una combinación de los métodos de análisis de sensibilidad más adecuados se puede llegar a una conclusión fiable y óptima (Patil y Frey, 2004).

Con el objetivo de proporcionar una visión completa del amplio número de métodos disponibles, presentamos una clasificación básica propuesta por Frey y col. (2003) en la Figura 6.1, y que contrasta con la propuesta por Zwietering y van Gerwen (2000).

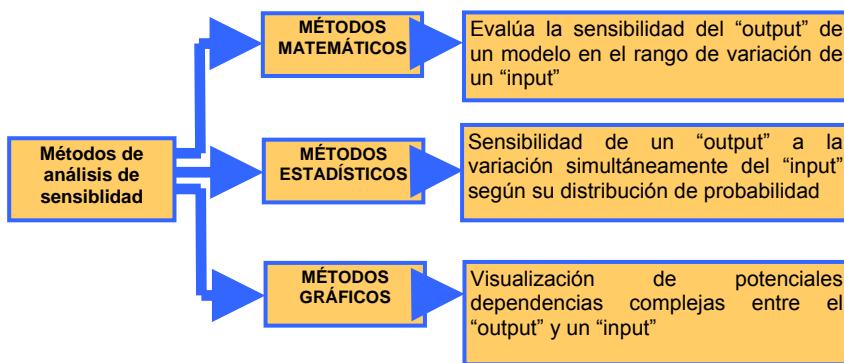


Figura 6.1 Clasificación de los métodos de sensibilidad (adaptado de Frey y col., 2003)

En la Figura 6.1, los métodos matemáticos y estadísticos corresponderían con los “deterministas” y “probabilísticos”, respectivamente, referidos por Zwietering y van Gerwen (2000). Sin embargo, en la Figura 6.1 se introduce algo de cierta importancia como la aplicación de los métodos gráficos. Como estudiaremos más adelante para el caso de diagramas de dispersión, una manera eficaz de determinar relaciones entre los “input” y “output” en un modelo es a través del análisis visual de la representación de las iteraciones del “input” frente a las del “output”. Asimismo, el método gráfico, al margen de su capacidad de evidenciar relaciones, tiene un gran potencial para facilitar la interpretación de los resultados derivados de un análisis de sensibilidad más complejo. No debemos olvidar que, a veces, datos de una ECRM (incluyendo el análisis de sensibilidad) pueden utilizarse por personas no

familiarizadas con la metodología y terminología empleada en su desarrollo, como por ej. los gestores del riesgo, que aunque son técnicos no tienen porqué poseer un conocimiento avanzado sobre métodos estadísticos y simulación.

Frey y Patil (2002) revisaron 10 métodos de análisis de sensibilidad:

- Análisis de sensibilidad nominal
 - *Nominal Range Sensitivity* (NRSA)
- Diferencia en el log odd ratio (tasa de eficacia)
 - *Difference in the log-odd ratio* (ALOR)
- Análisis de punto de equilibrio
 - *Break-Even Analysis* (BEA)
- Análisis de sensibilidad diferencial
 - *Automatic Differentiation Technique* (AD)
- Análisis de correlación y regresión /
 - *Correlation and Regression Analysis*;
- Análisis de varianza
 - *Analysis of Variance* (ANOVA)
- Método de superficie de respuesta
 - *Response Surface Method* (RSM)
- Test de sensibilidad de Fourier
 - *Fourier Amplitude Sensitivity Test* (FAST)
- Índice de información mutua
 - *Mutual Information Index* (MII)
- Diagrama de dispersión
 - *Scatter plots* (SP)

Patil y Frey (2004) afirmaron que ninguno de los citados métodos fue claramente superior a los demás. Sin embargo, se indicó que cada modelo de ECRM tiene sus propias características, y que esto favorece el empleo de unos métodos en lugar de otros. Por ejemplo, modelos de ECRM de tipo no lineal (o exponencial) no pueden ser analizados a través de métodos tales como el análisis de regresión, RSM, AD, ALOR o NRSA, ya que estos asumen una relación lineal entre variables ($y = ax + b$). La aplicación de métodos inadecuados puede dar lugar a interpretaciones erróneas o a información incompleta sobre las variables.

Por otro lado, a pesar de lo atractivo del método FAST, este solo puede utilizarse sobre variables discretas. Así, métodos como el ANOVA, SP o MII, que son independientes del tipo de relación existen entre las variables, parecen ser los más adecuados a las singularidades de los modelos de ECRM. Entre ellos, el MII puede implicar cierta complicación computacional debido al elevado número de simulaciones que son necesarias para su estimación.

Como conclusión parece recomendable, a raíz de lo comentado, usar varios métodos de sensibilidad lo que quizá contribuya a obtener conclusiones más fiables y certeras.

Aunque todos los métodos se definen de manera básica para modelos de una sola dimensión (sin separación entre variabilidad e incertidumbre), en su mayoría, tienen una versión desarrollada para su aplicación en modelos de dos dimensiones

(Mokhtari y Frey, 2005). Estos no han sido recogidos en este apartado dado que su inclusión supondría una mayor complejidad que no es propósito de la presente tesis.

6.2. Análisis de Correlación y Regresión: Gráficos de Tornado

El análisis de correlación y regresión es el método de sensibilidad más empleado en los estudios de ECRM, debido a que los científicos se encuentran más familiarizados con este tipo de métodos que, históricamente, se han aplicado para el análisis estadístico de datos experimentales.

Entre todos ellos, el más extendido es el coeficiente de correlación, que se define como la medida del grado de asociación o covarianza entre dos variables aleatorias. En nuestro ámbito, nos informa de la dependencia lineal que tiene el “output” sobre un “input” concreto del modelo. Cullen y Frey (1999) destacan que este coeficiente es sensible a dos factores:

- La intensidad de la relación lineal entre “input” y “output”
- El rango de variación del “output” relativo al rango de variación del “input”.

La fórmula del coeficiente de correlación (de Pearson) (r) es:

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{N}}{\sqrt{(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}) \times (\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N})}} \quad (6.3)$$

Este tipo de análisis es “post-simulación”, es decir, que la estimación del coeficiente se realiza usando los datos obtenidos en la simulación. Imaginemos, en una hoja de cálculo, en una columna, los valores del “input” para cada iteración, en otra columna, los valores correspondientes del “output”, resultado del modelo, y finalmente una tercera donde se encuentra la fórmula de la ecuación 6.3, que aplica las columnas anteriores.

Este índice oscila entre -1 y 1, donde 1 corresponde a una correlación perfecta entre “output” e “input”, de carácter positivo, y -1 de carácter negativo, el 0 significa ausencia de correlación. De modo que basado sobre este estadístico, las variables “input” pueden ser ordenadas de mayor a menor importancia.

Para el caso de modelos no lineales pero monotónicos (cuando la variable X aumenta, Y también aumenta), tenemos el coeficiente de correlación de *Spearman*, que ya hemos comentado. Este se basa en ordenar los valores “input” y “output” y en asignarles un valor de orden, como por ej., se ilustra en la Tabla 6.1:

Tabla 6.1. Procedimiento de ordenamiento de datos para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman.

“Input”	“Output”	Orden “output”	Orden “input”
4	21	4	3
10	212	1	1
8	12	2	4
6	33	3	2

La fórmula de coeficiente de correlación de Spearman (ρ) es:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{N(N^2 - 1)} \quad (6.4)$$

(los datos son ordenados y reemplazados en la ecuación por su respectivo orden)

donde D es el resultado de la diferencia entre los valores de orden asignados a los datos (x, y); y N es el número de parejas (x, y).

Otros métodos similares son el análisis de regresión (R^2), regresión multivariante, correlación parcial, y coeficiente de correlación estandarizado (Cullen y Frey, 1999). El primero asume que hay una relación lineal entre las variables; por tanto, su aplicación se debe limitar a modelos que presenten ese carácter. La regresión multivariante es la generalización del método anterior. Con él se puede considerar la interacción existente entre y dentro de un grupo de variables (“inputs”). A través del coeficiente de correlación parcial, y basado sobre la regresión multivariante, se puede medir la intensidad de la relación lineal entre el “output” y un “input”, excluyendo del análisis el efecto de otros “inputs”. Finalmente, tenemos el coeficiente de regresión estandarizado, una alternativa al anterior cuando los “inputs” tienen diferente escala.

Una manera ampliamente reconocida de presentar los resultados en este tipo de análisis (correlación y regresión) es mediante el uso de gráficos de Tornado (Análisis de Tornado). En este, los valores de los coeficientes se presentan en forma de barras cuyo tamaño es proporcional al valor del coeficiente. Normalmente, en un mismo gráfico se presenta los valores de varios “input” que son ordenados de mayor a menor coeficiente de arriba a abajo. La forma que presentan estos gráficos recuerda a un tornado, de ahí, su nombre. Un ejemplo de este tipo de gráficos puede ser observado en la Figura 6.2.

Los estudios suelen aplicar este tipo de métodos para identificar los “inputs” más importantes en el modelo, o que mayor efecto tienen sobre el “output”. Como mencionamos, estos métodos se basan en el grado de relación o dependencia existente entre variables. Sin embargo, lo que realmente determinaría que un “input” constituya un factor de riesgo es que los cambios en este “input” produzcan cambios significativos en la magnitud del “output” (riesgo final). En este sentido, la utilización de otros métodos de sensibilidad es clave para identificar de manera fiable los factores de riesgo en un modelo de ECRM.

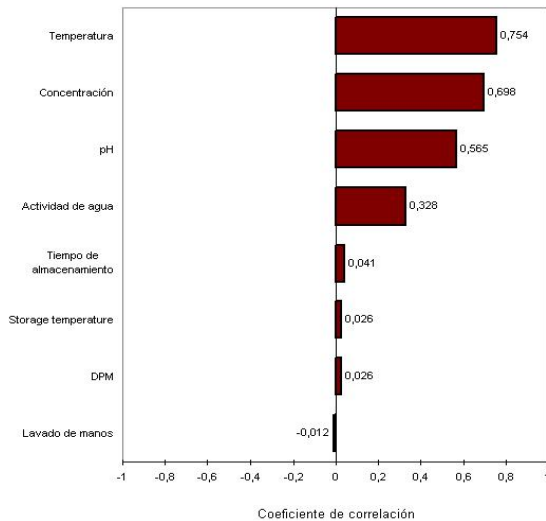


Figura 6.2 Un ejemplo de gráfico de tornado tomado del estudio de ECRM de *Staphylococcus aureus* en productos cárnicos cocidos en España (datos no publicados).

6.3. Análisis de varianza (ANOVA/MANOVA)

El propósito de este apartado no es explicar y desglosar los fundamentos y principios de un análisis de varianza, para lo cual recomendamos la lectura de cualquier libro de estadística básica (Casas, 1997). Lo que intentamos con este apartado es presentar un poderoso método para su aplicación en el análisis de sensibilidad en estudios de ECRM; estudios que, por otro lado, no han confiado hasta la fecha en este tipo de análisis para estudiar la sensibilidad del modelo y sus variables.

Probablemente, a pesar del amplio conocimiento que se tiene del análisis de varianza en otras áreas de la ciencia, es difícil considerar que un análisis como este, basado en la categorización de las variables, pueda ser útil para modelos eminentemente cuantitativos. Sin embargo, un análisis de varianza, en nuestro ámbito, puede ayudar a determinar si hay asociación entre un “input” y el “output”, sin asumir ningún tipo de relación entre ambos. Además, dado su carácter cualitativo, este método también puede usarse para evaluar “inputs” categóricos o incluso distintas variantes en la estructura del modelo (escenarios).

Para un análisis de varianza, los “inputs” son referidos como factores, y el “output” como respuesta. Los factores son agrupados en rangos de igual tamaño, que llamamos niveles del factor. Resumiendo, el análisis de varianza, a través del estadístico F , determina si hay diferencias significativas en la respuesta media entre distintos niveles de los factores (Tang y col., 2006).

Un análisis de varianza multifactorial considera un conjunto de factores, y así también, la interacción entre ellos. El factor puede ser el tipo de microorganismo

patógeno, área geográfica, un escenario concreto (por ej., implantación de una medida de control). Después del análisis de varianza, también puede aplicarse tests (*post-hoc*) que permiten considerar el diferente rango de los factores, tales como el test de Tukey o el test de Scheffé. En la Figura 6.3 se ilustra un ejemplo de aplicación de un análisis de varianza en modelos de ECRM.

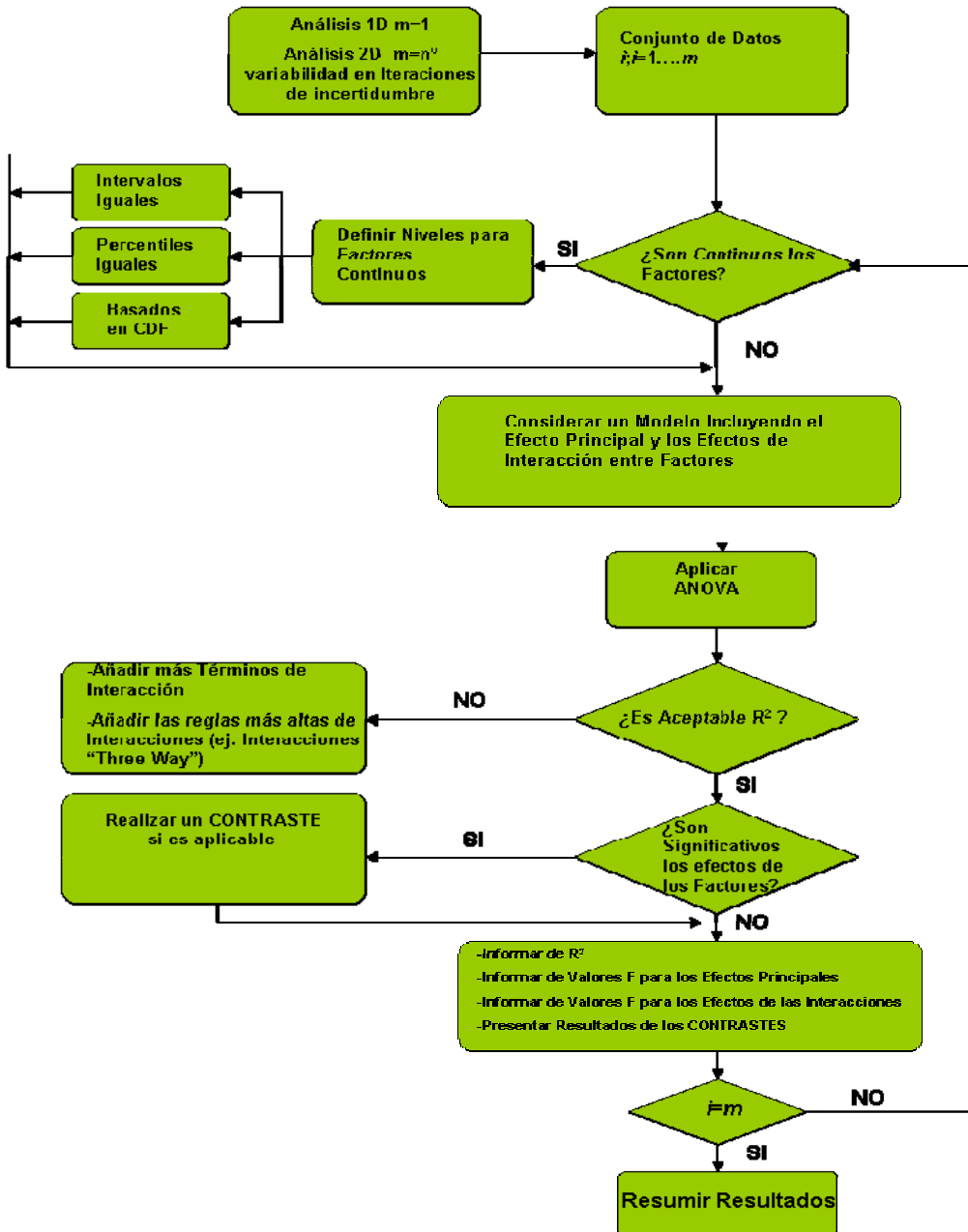


Figura 6.3. Un ejemplo de aplicación de ANOVA como análisis de sensibilidad.

El análisis de varianza al igual que el coeficiente de correlación puede proporcionarnos un ranking de los factores más determinantes en base al valor del estadístico F .

Como mencionamos, la principal ventaja de este método es su robustez ante violaciones de ciertas asunciones. No obstante, puede ser sensible a errores de medida sobre los factores o a la existencia de relaciones entre ellos. Además, cuando existe un gran número de factores, el método incrementa su dificultad computacional.

6.4. Diagramas de dispersión

El diagrama de dispersión es la representación gráfica de la relación existente entre un “input” y un “output”. Este consiste en la representación de las iteraciones o valores de la simulación para un “input” y el correspondiente “output” (Cullen y Frey, 1999).

A través del diagrama de dispersión se pueden evidenciar posibles dependencias, que en algunos casos pueden ser de gran complejidad y dificultad para ser detectadas por métodos estadísticos. En este sentido, en algunos casos, se pueden identificar zonas o valores en los cuales la relación se hace más intensa o produce un incremento o decremento más importante del “output”. En estos casos, podemos estar identificando límites críticos en el “input” (Vose 2000b). En la Figura 6.4 se representa un diagrama de dispersión.

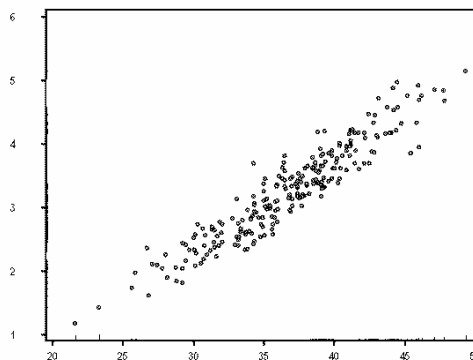


Figura 6.4 Un ejemplo de un diagrama de dispersión representando una relación lineal rectilínea entre las variables.

El diagrama de dispersión suele recomendarse como un primer paso en el análisis de sensibilidad de un modelo. El conocimiento del tipo de dependencia por este método sirve para seleccionar métodos estadísticos más adecuados.

Como una desventaja importante está el hecho de que para generar un diagrama de dispersión se necesita una reorganización de los valores obtenidos en la simulación del modelo (iteraciones), lo cual en algunos casos, si no es

suministrado por el software, puede ser tedioso y necesitar gran cantidad de tiempo. Para resolver esta dificultad Vose (2000b) indica la posibilidad de seleccionar un grupo significativo de las iteraciones simuladas. También, este método, por estar sujeto a la interpretación del asesor, puede dar lugar a juicios erróneos o incompletos de la relación encontrada.

6.5. Otras consideraciones

El análisis de sensibilidad es la herramienta básica para extraer la información de un modelo de ECRM, y así, poder, los gestores del riesgo, establecer medidas o estrategias de gestión más eficaces y precisas.

La verificación es un proceso que nos indica si un modelo está funcionando de acuerdo a lo que ha sido establecido para él. El análisis de sensibilidad puede ser fundamental para desarrollar este tipo de procesos. Ayuda a comprobar si la estructura o variables del modelo son correctas. En caso contrario, el análisis de sensibilidad identificaría aquellos aspectos erróneos, posibilitando el desarrollo de planes para su eliminación o mejora.

Los procesos de validación no son habituales en modelos de ECRM debido a la escasez de información, ya que dichos modelos suelen incluir fenómenos con muy poca probabilidad de ocurrencia. A pesar de la falta de validación, el análisis de sensibilidad puede ayudar a aumentar la confianza de gestores y evaluadores del riesgo en el modelo y en sus predicciones (Frey y Patil, 2002).

La aplicación del análisis de sensibilidad tiene una relación directa con la gestión del riesgo. La identificación de factores de riesgo, valores y zonas en estos puede ser de gran ayuda a la hora de determinar el OP o CR; y también pueden incidir sobre conceptos tales como límites críticos, criterios de proceso y producto en los programas de APPCC.

7. Comunicación del Riesgo

7.1. Percepción y dimensiones del riesgo

El riesgo es un término que ya definimos anteriormente en un sentido general, y al que volvemos a colación del tercer elemento del Análisis de Riesgos (AR): Comunicación del Riesgo (CR). Riesgo en un contexto alimentario es la función que expresa la probabilidad de que se produzca un efecto nocivo para la salud como consecuencia de un peligro en el alimento, así como la gravedad de ese efecto. Digamos, que desde una dimensión científico-técnica, riesgo = probabilidad+severidad. Sin embargo, esta definición no contempla la dimensión humana, o lo que es lo mismo, el factor psicológico, el cual irremisiblemente es parte esencial de cómo el público en general percibe el riesgo (Tabla 7.1). En estos casos, los autores suelen hablar de que la percepción riesgo= peligro+factor psicológico.

Tabla 7.1. Factores cualitativos que afectan la percepción del riesgo y su evaluación (adaptado de NRC, 1989)

Factor	Condiciones asociadas con mayor preocupación pública	Condiciones asociadas con menor preocupación pública
Potencial catastrófico	Daños y fatalidades agrupadas en tiempo y espacio	Daños y fatalidades no agrupadas y aleatorias
Familiaridad	No familiar (poco conocido)	Familiar
Comprensión	Mecanismos o procesos no comprendidos	Mecanismos o procesos comprendidos
Control personal	Fuera de control	Controlable
Exposición	Involuntaria	Voluntaria
Efecto en los niños	Niños en riesgo particular	Niños no específicamente en riesgo
Efectos/manifestaciones	Efectos retardados	Efectos inmediatos
Efecto en generaciones futuras	Riesgo para generaciones futuras	Sin riesgo para generaciones futuras
Identidad de las víctimas	Víctimas identificables	Víctimas estadísticas
Temor	Efectos temidos	Efectos no temidos
Confianza institucional	Poca confianza	Confianza
Atención de medios de comunicación	Mucha	Poca
Historia de accidentes	Accidentes severos y ocasionalmente menores	Sin historia de accidentes severos o menores
Equidad	Distribución no equitativa de riesgos y beneficios	Distribución equitativa de riesgos y beneficios
Beneficios	Poco claros	Claros
Reversibilidad	Efectos irreversibles	Efectos reversibles
Origen	Causado por acciones o fallas humanas	Causado por causas naturales ("actos de Dios")

Un factor de riesgo tan convencional como la pérdida de la vida no es tan determinante en la percepción personal del riesgo como se podría esperar. Factores tales como el beneficio percibido, la justicia en la distribución del riesgo, o confianza en las instituciones son de relevancia en la percepción del riesgo. Así, por ejemplo la percepción del riesgo es más alta cuando un evento catastrófico ocurre aisladamente

que cuando lo hace con mayor frecuencia (Tabla 7.1). Por ello, aunque los científicos puedan cuantificar el riesgo, este no es un fenómeno real, sino una construcción mental que depende de multitud de factores. La gran cantidad de factores nos da una idea de la complejidad de la percepción del riesgo. En este sentido, volviendo a la definición de riesgo del inicio, Jaeger y col. (2001) dan un contrapunto sobre la misma (no específica para alimentos) y definen el riesgo como “una situación o evento en el cual algún valor humano (incluyéndose los propios humanos) ha sido puesto en juego, y donde el resultado es incierto”

Tener en cuenta esta variedad dimensional en la percepción es clave para la efectividad de un proceso de comunicación del riesgo. En algunos casos, los científicos suelen establecer una expresión numérica para expresar el riesgo, que difícilmente entenderán, o en algunos casos interpretaran correctamente, los consumidores (Hampel, 2006; Mitchell, 2002).

7.2. Comunicación del riesgo

El objetivo de un proceso de comunicación de riesgo es producir un nivel adecuado de interés y acción en una audiencia sobre un determinado riesgo o peligro. Normalmente, los procesos de comunicación del riesgo fallan debido a que los gestores, evaluadores, y comunicadores del riesgo, en definitiva, técnicos, no tienen en cuenta que el público en general percibe el riesgo de manera distinta a como ellos lo hacen.

7.2.1. Audiencia

Para establecer procesos de comunicación efectivos es determinante caracterizar la audiencia. Para ello, se puede indagar sobre aspectos tales como: información demográfica, educativa, económica, etc. (Bruhn, 2005). Atendiendo a la teoría sobre percepción del riesgo, el ser humano percibe el riesgo según factores tales como la edad, grupo social, circunstancias específicas, etc. Teniendo esta información se pueden identificar segmentos o grupos y sus áreas de interés, y sobre esta base, establecer el medio y tipo de mensaje más adecuado.

Sin embargo, no siempre este proceso se conduce de una manera honesta y ética. Por ejemplo, Gordon (2003) destacó que patrocinadores o anunciantes pueden influir sobre el tipo de mensaje con el fin de incrementar o reducir la percepción del riesgo que los consumidores tienen sobre un peligro. Además, afirma que cuando la percepción no esta equilibrada, porque se favorezca un percepción sobrevalorada o infravalorada del riesgo, pueden ocasionar resultados desproporcionadas (ansiedad, demanda de reglamentación, rechazo de productos y medidas preventivas inadecuadas, perjuicio, etc.).

7.2.2. Mensaje

Como mencionamos previamente, el mensaje se debe adaptar al tipo de audiencia a la que va dirigida. La información acerca de la forma de vigilancia, control o reducción del riesgo es de gran importancia sobre su percepción. Normalmente, esta descripción ayuda a reducir la preocupación sobre un determinado peligro. También debe considerarse que para que un mensaje sea efectivo debe ser repetido, por tanto la continuidad en los programas de comunicación es clave para su efectividad. Otro aspecto importante hace referencia a que los mensajes no solo deben proporcionar información sino que además, según el caso, deben influir sobre el comportamiento de la audiencia. Para ello, se debe hacer partícipe al intercomunicador sobre los procesos de control y reducción del riesgo, siendo en algunos casos el último objetivo de un proceso de comunicación (Bruhn, 2005).

La credibilidad del comunicador y origen del mensaje tienen una gran influencia sobre si el mensaje es considerado o descartado. De este modo, cuerpos legislativos o reguladores con una baja credibilidad pueden no ser efectivos en el desarrollo de procesos de comunicación; incluso aunque estos estén bien argumentados, pueden tener un efecto negativo sobre la audiencia (Frewer, 1997).

Mitchell (2002) resume los principales elementos que deben ser considerados con respecto a los mensajes de riesgo:

- Los mensajes son primero juzgados por si su fuente es o no de confianza.
- La comunicación deliberada es frecuentemente un pequeña parte del mensaje que se transmite realmente.
- La respuesta al mensaje no solo depende del contenido sino también de la manera de proporcionarlo, concretamente del tono expresivo con que se presenta.
- La confianza es generalmente fomentada por la franqueza, tanto en evitar el secretismo como en la disponibilidad para escuchar.

7.2.3. El medio

Normalmente científicos o en general expertos comunican el riesgo a través de medios muy específicos y exclusivos (publicaciones, foros de expertos y conferencias). Este abanico de opciones no está disponible para el público en general, el cual normalmente recibe información a través de los medios de comunicación. De hecho, esta suele ser con gran frecuencia la primera y única fuente de información sobre riesgo para el público. Los medios pueden tener dos objetivos:

- Educar e informar
- Obtener un beneficio o ventaja

Es más, como mencionamos en un apartado anterior, la manipulación de los medios sobre el mensaje pueden influir intencionadamente influir sobre una mayor o menor percepción del riesgo. Los medios normalmente conocen cuáles son los factores que estimulan o amplifican el interés mediático sobre un historia; así, un posible riesgo sobre la salud pública puede hacer una historia más interesante y atrayente, si esos factores son mayores o aparentan serlo (Mitchell, 2002).

7.3. Directrices de la FAO/WHO respecto a la Comunicación del Riesgo microbiano en alimentos

En el presente apartado se resumen el documento FAO/WHO (1998) sobre las bases de la CR en alimentos. Esta es la etapa que ha presentado un menor desarrollo dentro del esquema del AR. Sin embargo, en contraposición, puede ser una de las más complejas dado su carácter multidimensional e interactivo.

La definición de CR es: el intercambio interactivo de información y opiniones respecto al riesgo y los factores asociados al riesgo, entre los responsables de la Evaluación del Riesgo (ER), Gestión del Riesgo (GR), consumidores y otras partes interesadas (FAO/WHO, 1998). Además, ha sido descrita como un elemento que integra procesos y procedimientos que:

- a) engloban e informan a todas las partes interesadas del proceso de análisis de riesgo;
- b) ayuda al desarrollo de procesos de toma de decisiones transparentes y creíbles;
- c) infunde confianza en la GR asociado a alimentos (Figura 7.1).



Figura 7.1. Partes involucradas en la comunicación del riesgo

7.3.1. Objetivos del proceso de Comunicación del Riesgo

- Promover el conocimiento y entendimiento de todos los participantes sobre el tema en consideración.

- Promover la consistencia y transparencia sobre la toma de decisiones e implementación de medidas de gestión del riesgo.
- Proveer una base sólida para entender las decisiones de manejo de riesgo propuestas o implantadas.
- Mejorar la eficacia y eficiencia del proceso del AR.
- Contribuir al desarrollo y entrega de información y programas de educación efectivos.
- Promover confianza pública en las instituciones encargadas de tomar decisiones
- Promover la participación de todos los sectores interesados
- Intercambiar información sobre las actitudes, conocimientos, valores, prácticas y percepciones relativas a riesgos

Esta visión general se puede enfocar a aspectos más concretos, también mencionados en el citado documento de la FAO/WHO (1998), entre los cuales exponemos aquellos que han sido considerados para el desarrollo de la presente Tesis:

- En los nuevos enfoques de seguridad alimentaria basados en el riesgo, la comunicación del riesgo juega un importante papel como el medio a través del cual se consideran todos los datos e información disponible que serán utilizados en las fases de ER y GR.
- Es necesario que un proceso de ER esté acompañado de un proceso de comunicación entre los responsables de la evaluación, los gestores, y otras partes interesadas de manera que los primeros puedan enfocar y determinar sus objetivos en función de los intereses de los segundos y terceros. En este sentido, los perfiles del riesgo, ayudan a crear un proceso de intercambio de información entre ambas partes, adecuándose así la evaluación para dar respuesta a las cuestiones de gestión planteadas.
- Caracterización del Riesgo es el medio primario por el cual los resultados de la ER microbiano son comunicados a gestores del riesgo y a otras partes interesadas. El empleo de conceptos matemáticos, terminología específica, etc. dan lugar a ciertas dificultades de comprensión entre responsables de la evaluación, gestores del riesgo y otras partes interesadas. Por tanto, se debería desarrollar y favorecer un marco lingüístico común para posibilitar el entendimiento entre todas las partes interesadas. En términos más concretos, y como ya mencionamos a lo largo del presente bloque, los resultados de una ER, aunque complejos, deben ser adaptados de la manera más adecuada para su comprensión

por parte de los gestores del riesgo en su objetivo para el establecimiento de medidas de gestión efectivas.

- La comunicación interactiva entre las diferentes partes interesadas tiende a garantizar transparencia, facilitar la consistencia y mejorar los procesos de GR. Además, cuando una decisión de gestión ha sido tomada finalmente, es importante establecer procesos de comunicación a través de los cuales todas las partes puedan conocer las bases para tal decisión.

7.3.3. Barreras para una comunicación del riesgo efectiva

Las barreras existen y deben ser identificadas para así poder corregirlas y posibilitar una efectiva comunicación del riesgo. La FAO identifica tres categorías de barrera, las dos primeras hacen referencia al tipo de institución y al procedimiento dentro del AR, y la tercera barrera se relaciona con el tipo de contexto, en concreto al esfuerzo que se realiza para comunicar el riesgo al público en general y a otras partes interesadas.

Además, el documento de la FAO hace una recopilación de un conjunto de procedimientos a considerar en el desarrollo de un proceso de comunicación efectivo, que son divididas en 3 categorías: Preparación y ensamblaje; Diseminación y distribución; Revisión y evaluación. Su contenido dependerá según estemos en estrategias de comunicación de riesgo orientadas a situaciones rutinarias o de crisis.

Finalmente el documento concluye ciertos aspectos clave para una correcta comunicación del riesgo y que después se traducen a recomendaciones para gobiernos y organizaciones. Los puntos destacados fueron:

- Implicación e interacción de todas las partes interesadas
- Empleo de personas formadas en comunicación del riesgo
- Garantía del que la comunicación del riesgo es recibida y comprendida
- Fomento de transparencia durante el proceso completo

Referencias

- Adams, M.R., C.L. Little y M.C. Easter (1991). Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on growth of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 65 - 71.
- Baranyi, J., T. Ross, T.A. McMeekin, y T.A. Roberts (1996). Effects of parametrization on the performance of empirical models used in "predictive microbiology". *Food Microbiol.* 13, 83 - 91.
- Baranyi, J., T.P. Robinson, A. Kaloti, y B.M. Mackey (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 61 - 75.
- Baranyi, J., y M. Tamplin (2004). ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. *J. Food Prot.* 67, 1834 - 1840.
- Baranyi, J., y T.A., Roberts (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277 - 294.
- Bemrah, N., M. Sanaa, M.H. Cassin, M.W. Griffiths, y O. Cerf (1998). Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prev. Vet. Med.* 37, 129 - 145.
- Bemrah, N., H. Bergis, C. Colmin, A. Beaufort, Y. Millemann, B. Dufour, J.J. Benet, O. Cerf, y M. Sanaa (2003). Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 17-30.
- Bernaerts, K., E. Dens, K. Vereecken, A. Geeraerd, A.R. Standaert, F. Devlieghere, J. Debevere y J.F. Van Impe (2004). Concepts and tools for predictive modeling of microbial dynamics. *J. Food Prot.* 67, 2041 - 2052.
- Beumer, R., y R., Kusumaningrum (2003). Kitchen hygiene in daily life. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 51, 299 - 302.
- Bigelow, W.D., G.S. Bohart, A.C. Richardson, y C.O. Ball (1920). Heat penetration in processing canned foods. *Natl. Cannery Assoc. Bull.* 16-L.
- Bruhn, C.M. (2005). Explaining the concept of health risk versus hazards to consumers. *Food Control* 16, 487 - 490.
- Buchanan, R.L., J.L. Smith, y W. Long (2000). Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 159 - 172
- CAC (Codex Alimentarius Commission) (2003). Guidelines on the judgement of equivalence of sanitary measures associated with food inspection and certification systems. CAC GL 53-2003. Secretariat of the joint FAO/WHO food standards programme, FAO, Roma.
- CAC (Codex Alimentarius Commission) (1997). Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. Annex to the recommended international code of practice-general principles of food hygiene, CAC/RCP 1-1969, Rev. 3-1997. Secretariat of the joint FAO/WHO food standards programme, FAO, Roma.

CAC (Codex Alimentarius Commission) (1999). Principles and guidelines for the conduct of a Microbiological Risk Assessment. CAC/GL-30-1999. Secretariat of the joint FAO/WHO food standards programme, FAO, Roma.

Casas Sanchez, J.M. (1997). Inferencia Estadística. Ed. Centro de Estudios Ramón Areces, S.A., Madrid.

Cassin, M.H., A.M. Lammerding, E.C.D. Todd, W. Ross, R.S. McColl (1998). Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 21 - 44.

Cavitte, J-Ch. (2004). Monitoring of zoonotic agents/zoonoses: European Union legislation. Cost Action 920 on foodborne zoonoses, working group 3: quantitative risk assessment. Workshop on data needs in risk assessment, Pamplona (España), 28 - 30 de Junio.

Cayley, S., B.A. Lewis, y T.M. Record (1992). Origins of osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K2. *J. Bacteriol.* 174, 1586 - 1595.

CFSAN/FDA (Center for Food Safety and Applied Nutrition/Food and Drug Administration Quantitative) (2005). Risk Assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. <<http://www.cfsan.fda.gov/~acrob/at/vpra.pdf>>

Chen, Y., W.H. Ross, V.N. Scott, y D.E. Gombas (2003). *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. *J. Food. Prot.* 66, 570 - 577

Christensen, B.B., H. Rosenquist, H.M. Sommer, N.L. Nielsen, S.F. Andersen, y B. Nørrung (2005). A model of hygiene practices and consumption patterns in the consumer phase. *Risk Anal.* 25, 49 - 60

Coleman, M y H. Marks (1998). Topics in dose-response modelling. *J. Food Prot.* 61, 1550 - 1559.

Cullen, A.C. y H.C. Frey (1999). Probabilistic techniques in exposure assessment. Plenum Press: Nueva York.

Dahms, S. (2001). Lectures: Microbiological sampling plans-Statistical aspects. <www.foodscience.afisc.csiro.au/icmsf/SD2002_website.pdf>

de Swarte, C., y R.A. Donker (2005). Towards an FSO/ALOP based food safety policy. *Food Control* 16, 825 - 830.

den Aantrekker, E.D., R.M Boom, M.H. Zwietering, y M. van Schothorst (2003) Quantifying recontamination through factory environments-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 117-130.

Dennis, S.B., M.D. Milotis y R.L. Buchanan (2002). Microbiological risk assessment in food processing. Chapter 5: Hazard characterization/dose-response assessment. Ed. M. Brown and M. Stringer. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Dym, C.L. (2004). Principles of mathematical modeling. Elsevier Academic Press Academic, Londres. Pag. 4.

ECR (Economic Research Service). (2000). Economics of foodborne disease: estimating the benefits of reducing foodborne. <http://www.ers.usda.gov/data/Foodbo_rneillness/>

EU 03/99 Council Directive (2003). Monitoring of zoonoses and zoonotic agents. Official Journal L 325/31, (12.12.2003).

European Commission (1998). Principles for the development of risk assessment of microbiological hazards under directive 93/43/EEC concerning the hygiene of foodstuffs. ISBN 92-828-1871-3. Office for official publications of the European Communities, Luxemburgo.

European Commission (2003). Risk assessment of food borne bacterial pathogens: Quantitative methodology relevant for human exposure assessment (final report). <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out308_en.pdf>

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (1995). Application of risk analysis to food standards. Report of the joint FAO/WHO expert consultation. FAO/WHO, Ginebra, 13-17 de Marzo.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (1997). Risk management and food safety. Report of a joint FAO/WHO consultation. FAO/WHO, Roma y Ginebra, 27-31 Junio 1997.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (1998). Application of risk communication to food standards and food safety. Report of the joint FAO/WHO expert consultation. FAO/WHO, Roma, 2-6 de Febrero.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2000). The interaction between assessors and managers of microbiological hazards in food. Report of a WHO expert consultation, Kiel, 11-15 Marzo 2000.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2001a). Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods. General requirements. CAC/GL 21-1997. Joint FAO/WHO food standards programme, Codex Alimentarius Commission. FAO/WHO, Roma. <<http://www.fao.org/DOCREP/004/Y1579E/Y1579E00.HTM>>

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2001b). Codex Alimentarius Commission. Procedural manual. Twelfth Edition: Procedures for the elaboration of codex standards and related texts. Joint FAO/WHO food standards programme, codex alimentarius commission. FAO/WHO, Roma. <<http://www.fao.org/docrep/005/Y2200E/y2200e04.htm#bm04>>

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2002). Proposed draft principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related text. Report of a joint FAO/WHO consultation, Kiel, FAO/WHO and Institute for Hygiene and Food Safety of the Federal Dairy Research Centre, Roma, Ginebra y Kiel, 18-22 Marzo, 2002.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2002). Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens: technical report. <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/salmonella.pdf>>

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2003). Guidelines on hazard characterization for pathogens in food and water for Foods modeling approach.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2004). Definitions on food safety objective, performance objective and performance criterion. Joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on food of the hygiene. Thirty-sixth session. Alinorm 04/27/13. FAO/WHO, Roma y Ginebra.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/ World Health Organization) (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report <http://www.fao.org/es/ESN/jemra/listeria_en.stm>

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/ World Health Organization) (2005a). Proposed draft principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management at step 5. Joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on food hygiene. Thirty-seventh session. Alinorm 05/28/13. FAO/WHO, Roma y Ginebra.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/ World Health Organization) (2005b). Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters: interpretative summary and technical report. <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra8.pdf>>

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/ World Health Organization) (2006). Proposed draft guidelines for the validation of food hygiene control measures at step 4. Joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on food hygiene. Thirty-eighth session. CX/FH 06/35/08. FAO/WHO, Roma y Ginebra.

FDA/USDA/CDC (Food Safety and Inspection Service/U.S. Department of Agriculture/Center for Diseases Control) (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. <<http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>>

Frewer, L.J., C. Howard, D. Hedderley, y R. Shepherd (1997). The elaboration likelihood model and communication about food risk. *Risk Anal.* 17, 759 - 770.

Frey, H.C. y S.R. Patil (2002). Identification and review of sensitivity analysis methods. *Risk Anal.* 22, 553 - 579.

Frey, H.C. A. Mokhtari, y J. Zheng (2003). Recommended practice regarding selection, application, and interpretation of sensitivity analysis methods applied to food safety risk process models. Society of Risk Analysis 2003 annual meeting. Baltimore (EEUU), 8 - 10 de Diciembre.

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/U.S. Department of Agriculture) (2001). Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/00-023N/00-023NReport.pdf>>

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/U.S. Department of Agriculture) (2003). Risk assessment for *Listeria monocytogenes* in deli meats. <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/97-013F/ListeriaReport.pdf>>

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/U.S. Department of Agriculture) (2005a). Risk assessment for *Clostridium perfringens* in ready-to-eat and partially cooked meat and poultry products. <http://www.fsis.usda.gov/PDF/CPerfringens_Risk_Assess_ExecSumm_Sep2005.pdf>

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/ U.S. Department of Agriculture) (2005b). Risk assessment for the impact of lethality standards on salmonellosis from ready-to-eat meat and poultry products. <http://www.fsis.usda.gov/PDF/Salm_RTE_Risk_Assess_Sep2005.pdf>

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/ U.S. Department of Agriculture) (2005c). Risk assessments of *Salmonella Enteritidis* in shell eggs and *Salmonella* spp. in Egg Products. <http://www.fsis.usda.gov/PDF/SE_Risk_Assess_Oct2005.pdf>

Gill, C.O., T. Jones, K. Rahn, A. Houde, J.C. McGinnis, S. Campbell, R.A. Holley, y D.I. LeBlanc (2002). Control of product temperatures during the distribution of retail ready beef to stores and vacuum packaged beef to restaurants. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 22, 422 - 428

Giovannini, A., V. Prencipe, A. Conte, L. Mario, A. Petrini, F. Pomilio, V. Rizzi, y G. Migliorati (2004). Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. *Food Control* 15, 139 - 144.

Gordon, J. (2003). Risk communication and foodborne illness: Message sponsorship and attempts to stimulate perceptions of risk. *Risk Anal.* 23, 1287 - 1296.

Gorris, L.G.M. (2005). Food safety objective: An integral part of food chain management. *Food Control* 16, 801 - 809.

Haas, C.H., J.B. Rose, C.P. y Gerba (1999). Quantitative microbial risk assessment. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York.

Hald, T., D. Vose, H.C. Wegener, y T. Koupeev (2004). A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 24, 255 - 269.

Hampel, J. (2006). Different concepts of risk: A challenge for risk communication. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 5 - 10.

Hartnett, E., L.A. Kelly, G. Gettinby, y M. Wooldridge (2002). A quantitative risk assessment for campylobacters in broilers: work in progress. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50, 161 - 165.

Havelaar, A.H., M.A. de Wit, R. van Koningsveld, y E. van Kempen (2000). Health burden in the Netherlands due to infection with thermophilic *Campylobacter* spp. *Epidemiol. Infect.* 125, 505 - 522.

Havelaar, A.H., y J.M. Melse (2003). Quantifying public health risks in the WHO Guidelines for drinking-water quality. A burden of disease approach. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven. Report N°. 734301022.

Havelaar, A.H., M.J. Nauta, J.T. Jansen (2004). Fine-tuning food safety objectives and risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 11 - 29.

Hoffman, F.O. y J.S. Hammonds (1994). Propagation of uncertainty in risk assessments: the need to distinguish between uncertainty due to lack of knowledge and uncertainty due to variability. Conference proceedings: "When and how can you specify a probability distribution function when you don't know much?" *Risk Anal.* 14, 707 - 712.

Holcomb, D.L., M.A. Smith, G.O. Ware, Y.C. Hung, R.E. Brackett, y M.P. Doyle (1999). Comparison of six dose-response models for use with food-borne pathogens. *Risk Anal.* 19, 1091 - 1100.

Hugas, M y P. Makela (2004). How to use nacional data on zoonoses in QMRA at the European level. EFSA tools for QMRA: expert panel and data collection systems in zoonoses. Cost Action 920 on foodborne zoonoses, working group 3: quantitative risk assessment. Workshop on data needs in risk assessment, Pamplona (España), 28 - 30 de Junio. <<http://www.cost920.com/PamplonaProceedings.pdf>>

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1997). Establishment of microbiological safety criteria for foods in international trade". *Wld. Hlth. Statist. Quart.* 50, 119 - 123

ICMSF (International Commission on the Microbiological Specifications of Foods) (2002). Microorganismos de los alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria. Editorial Acribia, Zaragoza.

Jaeger, C., O. Renn, E.A. Rosa, y T. Webler (2001). Risk, uncertainty, and rational action. *Earthscan*. Londres.

Jouve, J.L. (1999). Establishment of food safety objectives. *Food Control* 10, 303 – 305

Jouve, J.L. (2002). Microbiological risk assessment in food processing. Chapter 2: Microbiological risk assessment (MRA): an introduction. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. Pags.47-63.

Kennedy, J., I.S. Blair, D.A. McDowell y D.J. Bolton (2005). The microbiological status of non-food contact Surfaces in domestic kitchens and the growth of *Staphylococcus aureus* in Domestic Refrigerators. *Food Prot. Trends* 35, 974 - 980.

Lammerding, A.M. y G.M. Paoli (1997). Quantitative risk assessment: an emerging tool for emerging foodborne pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 3(4), 483 - 487.

Lammerding, A.M. y A. Fazil (2000). Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 147 - 157.

Legan, D., M. Vandeven, C. Stewart y M. Cole (2002) Foodborne pathogens: Modelling the growth, survival and death of bacterial pathogens in foods. ed.

Blackburn, C.d.W. and McClure, P.J. Woodhead Publishing. Cambridge. Pags. 53 - 95.

Legan, J.D., M.H. Vandeven, S. Dahms, y M.B. Cole (2001). Determining the concentration of microorganisms controlled by attributes sampling plans. *Food Control* 12, 137 - 147

Limpert, E., W.A. Stahel, y M. Abbt (2001). Log-normal distributions across the science: keys and clues. *Bioscience* 51, 341 - 352.

Lindqvist, R., S. Sylvén y I. Vagsholm (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 155 - 170.

Malakara, P.K., G.C. Barkera, M.H. Zwietering, y K. van't Riet (2003). Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 263 - 272.

Mc Master, R.L. y E.C.D. Todd (2004). Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. *Risk Anal.* 24, 409 - 415.

McCullagh, P., y J.A. Nelder (1989). Generalized linear models. Chapter 1: Introduction. 2 ed. Chapman & Hall, London.

McKellar, R.C. (2001). Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells. *J. Appl. Microbiol.* 90, 407 - 413

McKellar, R.C. y X. Lu (2004). Modeling microbial responses in foods. CRC Press. Boca Raton, Florida.

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

McMeekin, T.A., R.E. Chandler, P.E. Doe, C.D. Garland, J. Olley, S. Putro, y D.A. Ratkowsky (1987). Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *J. Appl. Bacteriol.* 62, 543 - 550.

McMeekin, T.A., J.N. Olley, T. Ross, y D.A. Ratkowsky (1993). Predictive microbiology: theory and application, Wiley, Nueva York.

Mead, P., L. Slutsker, A. Dietz, L. McCaig, J. Bresee, C. Shapiro, P. Griffin, y R. Tauxe (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607 - 625.

Mellefont, L.A. y T. Ross (2003). The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 295 - 305.

Métris, A., Y. Le Marc, A. Elfving, A. Ballagi, y J. Baranyi (2005). Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 13 - 19.

- Mitchell, R. (2002). Microbiological risk assessment in food processing. Chapter 8: Risk communication. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. Pags. 155 - 171.
- Mokhtari, H. y C.H. Frey (2005). Sensitivity analysis of a two-dimensional probabilistic risk assessment model using analysis of variance. *Risk Anal.* 25, 1511 - 1525.
- Moran, P.A. (1954). The dilution assay of viruses. *J. Hyg.* 52, 189 – 193.
- Morgan, M.G. y M. Henrion (1990). Uncertainty: a guide dealing with uncertainty in quantitative risk assessment and policy analysis. Cambridge University Press, Nueva York.
- Nauta, M.J. (2001). A modular process risk model structure for quantitative microbiological risk assessment and its application in an exposure assessment of *Bacillus cereus* in REPFED, RIVM report 149106007, Bilthoven.
- Nauta, M.J. (2002). Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? *Int. J. F. Microbiology* 73, 297-304.
- Nauta, M.J. (2005). Microbiological risk assessment models for partitioning and mixing during food handling. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 311 - 322.
- Nauta, M.J., E.G. Evers, K. Takumi, y A.H. Havelaar (2001). Risk assessment of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands in a REPFED, RIVM-rerport 257851003. Bilthoven.
- Notermans, S., A.W.Barendz, y F. Rombouts (2002). Microbiological risk assessment in food processing. Chapter 2: The evolution of microbiological risk assessment. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. Pag. 6
- NRC (Nuclear Regulatory Commission) (1989). Improving risk communication. Committee on risk perception and communication, commission on behavioral and social sciences and education, and commission on physical sciences, mathematics and resources. National Academy Press, Washington D.C. Pag. 35.
- Olkin, I., L.J. Gleser, y C. Derman (1980). Probability models and applications. Macmillan Publishing Co., Inc, Nueva York.
- Oscar, P. (2004). A quantitative risk assessment model for *Salmonella* and whole chickens. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 231 - 247.
- Patil, S.R. y H.C. Frey (2004). Comparison of sensitivity analysis methods based of applications to a food safety risk assessment model. *Risk Anal.* 24, 573 - 585.
- Peebles, P.Z. (1987). Probability, random variables and random signal principles. McGraw-Hill Inc, Nueva York.
- Pérez-Rodríguez, F., R.M.Gimeno-Garcia, G. Zurera, A. Diaz, E. Jiménez (2003). Exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in cooked ham using the MPRM method. Society for risk analysis annual meeting: bridging risk divides, Baltimore (EEUU), 7-10 de Diciembre.
- Pérez-Rodríguez, F. (2004). Looking for solutions for not available data in exposure assessment of cooked meat. Cost Action 920 on foodborne zoonoses, working group

3: quantitative risk assessment. Workshop on data needs in risk assessment, Pamplona (España), 28 - 30 de Junio.

Ragsdale, C.T. (2001). Spreadsheet modelling and decision analysis. Capítulo 4: sensitivity analysis and the simplex method. South-Western College Publishing, Cincinnati (EEUU). Pag. 137.

Ratkowsky, D.A., J. Olley, T.A. McMeekin, y A. Ball (1982). Relation between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* 149, 1 - 5.

Ratkowsky, D.A., R.K. Lowry, T.A. McMeekin, A.N. Stokes, y R.E. Chadler (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 154, 1222-1226

Reij, M.W., W.D. Aantrekker, W.D., y ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 1 - 11.

Rosenquist, H., N.L. Nielsen, H.M. Sommer, B. Norrung, y B.B. Christensen (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 87 - 103.

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 501 - 508.

Sanaa, M., L. Coroller, y O. Cerf (2004). Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two soft cheeses made from raw milk: camembert of Normandy and brie of meaux. *Risk Anal.* 24, 389 - 399

Saltelli, A. (2002). Sensitivity analysis for importance assessment. *Risk Anal.* 22, 579 - 588.

Schaffner, D.W. (2004). Modeling microbial responses in foods. Chapter 10: Models-What comes after the next generation? CRC Press. Boca Raton, Florida.

Stewart, C.M., M.B. Cole, D.W. Schaffner (2003). Managing the risk of Staphylococcal food poisoning from cream-filled baked goods to meet a food safety objective. *J. Food Prot.* 66, 1310 - 1325.

Stringer, M. (2005). Summary report: food safety objectives-role in microbiological food safety management. *Food Control* 16, 475 - 494.

Swinnen, I.A.M., K. Bernaerts, E.J.J. Dens, A.H. Geeraerd, y J.F. Van Impe (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 137 - 159

Tang, Y., P. Reed, T. Wagener, y K. van Werkhoven (2006). Comparing sensitivity analysis methods to advance lumped watershed model. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* 3, 3333 - 3395.

te Giffel, M.C., y M.H. Zwietering (1999). Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 135 - 149.

Todd, E.C.D. (2003). Microbiological safety standards and public health goals to reduce foodborne disease. *Meat Sci.* 66, 33 - 43.

Toyofoku, H. (2006). WHO Guides. Guiding future action for food safety: Implementation of risk management decision. <www.wpro.who.int/fsi_guide/files/implementation_of_risk_management_decision.pps>

van Gerwen S.J., M.C. te Giffel, K. van't Riet, R.R. Beumer, y M.H. Zwietering (2000). Stepwise quantitative risk assessment as a tool for characterization of microbiological food safety. *J. Appl Microbiol.* 88, 938 - 951.

van Gerwen, S.J. y M.H. Zwietering (1998). Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *J. Food Prot.* 61, 1541 - 1549.

van Gerwen, S.J. y L. Gorris (2004). Application of elements of microbiological risk assessment in the food industry via a tiered approach. *J. Food Prot.* 67, 2033 - 2040.

van Schothorst, M. (1998). Principles for the establishment of microbiological food safety objectives and related control measures. *Food Control* 9, 379 - 384.

van Schothorst, M. (2002). Microbiological risk assessment in food processing. Chapter 9: Implementing the results of a microbiological risk assessment: pathogens risk management. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. Pág. 188.

van Schothorst, M.(2005). A proposed framework for the use of FSOs. *Food Control* 16, 811 - 816.

Vorst, K. L., E. C. Todd, F. Perez-Rodríguez, R. McMasters, y E. T. Ryser, (2004). Transfer of *Listeria monocytogenes* from a delicatessen slicer to ready-to-eat meat products. IAFP's 91st Annual Meeting, Phoenix (EEUU), 8-11 de Agosto.

Vose, D. (2000a). Risk analysis. A quantitative guide. John Wile & Sons Inc., Nueva York.

Voysey, P. (2000). An introduction to the practice of microbiological risk assessment for the food industry applications. Campden and Chorleywood Food. Chipping Camden: Research Association Group, Guideline No 28, 1-104.

Voysey, P., K. Jewell, y M. Stringer (2002). Microbiological risk assessment in food processing. Chapter 7: Risk characterization. Ed. M. Brown and M. Stringer. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Walls, I. y R.L. Buchanan (2005). Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. *Food Control* 16, 795 - 799.

Whiting, R.C., y R.L. Buchanan (1997). Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid eggs. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 111 - 125.

Whiting R.C., A. Rainosek, R.L. Buchanan, M. Miliotis, D. LaBarre, W. Long, A. Ruple, y S. Schaub (2006). Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 263 - 267.

Wooldridge, M. (2002). Data quality, combining multiple data sources, and distribution fitting. The 1st international conference on microbiological risk assessment: foodborne hazards. Maryland (EEUU). 24 - 26 de Julio. <http://www.foodrisk.org/powerpoint/racconf/Wooldridge_files/frame.htm>

WTO (World Trade Organization) (1995). The WTO agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures (SPS Agreement). <http://www.wto.org/english/trt_op.>

Zhao, P., T. Zhao, M.P. Doyle, J.R. Rubino, y J. Meng (1998). Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *J. Food Protect.* 61, 960 - 963.

Zwietering, M.H., T. Wiltzes, J.C. De Wit y K. van't Riet (1992). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food Prot.* 55, 973 - 979.

Zwietering, M.H y S.J. van Gerwen (2000). Sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 213-221

Zwietering, M. (2005). Practical considerations on food safety objectives. *Food Control* 16, 817 - 823.

Zwietering M.H., y F. Pérez-Rodríguez (2006). Exposure to microorganisms: the devil is in the tail. Food Micro 2006, 20th international symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), Bologna (Italia) 29 de Agosto - 2 de Septiembre.

III. OBJETIVOS

Objetivos

- Profundizar en el conocimiento y desarrollo de metodologías para la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM) en un contexto “probabilístico”.
- Desarrollar herramientas interpretativas para los modelos de ECRM. Aplicación de metodologías de análisis de sensibilidad.
- Estudiar y analizar los fenómenos de contaminación cruzada en alimentos desde una perspectiva de seguridad alimentaria: Identificación de factores de riesgo y revisión de los modelos matemáticos de contaminación cruzada.
- Desarrollar modelos matemáticos de contaminación cruzada en alimentos para su aplicación en la ECRM.
- Aplicar procedimientos para la incorporación de modelos matemáticos de contaminación cruzada en alimentos en la ECRM.
- Analizar el impacto de los fenómenos de contaminación cruzada sobre la gestión del riesgo: Aplicación de los Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO).

IV. RESULTADOS

1. Contaminación cruzada: Factores de riesgo y modelos matemáticos.

Es ampliamente conocido, y está demostrado, que los fenómenos de contaminación cruzada son un factor importante en la transmisión de toxiinfecciones alimentarias (TIAs).

El fenómeno de contaminación cruzada se puede definir como un proceso de transferencia microbiana entre distintas superficies en un ambiente alimentario, siendo una de ellas el propio alimento.

En general, la transferencia microbiana puede ser clasificada en tres tipos: de aire a producto (SF); de superficie a alimento en fluidos (SFF); y de superficie a alimento por contacto (SFC). La transferencia SFC es el tipo más frecuente, dada su alta incidencia en la etapa de consumo doméstico. Sin embargo, se han realizado pocos estudios que hayan tratado este tipo de fenómenos.

Los métodos tradicionales de muestreo de superficies revisados no son completamente efectivos, si bien concluimos que la combinación de diferentes métodos posibilita una mejor tasa de recuperación. Además, se indica que otros métodos más actuales como son los equipos de ultrasonidos, la microscopia de fluorescencia, etc. podrían mejorar la precisión y exactitud en los resultados de los estudios de transferencia.

Los estudios de transferencia bacteriana pueden ser divididos en dos grupos basándonos en el grado de control a que se someten los factores que influyen sobre la transferencia. En primer lugar, tenemos aquellos que se realizan con un control exhaustivo de estos factores, evaluando, por tanto, en estos casos, el efecto de estos sobre el grado de transferencia. En segundo lugar se encuentran aquellos que se realizan en condiciones no controladas sin una consideración específica de los factores. Estos tienen lugar simulando condiciones reales (cocina doméstica, industria, restauración, etc.). La consideración de ambos tipos de estudios es clave para comprender la transferencia bacteriana y los factores implicados.

Los factores que gobiernan los fenómenos de transferencia SFC no son conocidos totalmente, aunque está probado que están íntimamente relacionados con las características de adherencia de la bacteria a la superficie. Simplificando, estos factores pueden ser clasificados en factores ambientales/extrínsecos o en factores de especie/intrínsecos. La presente revisión sugiere que niveles elevados de ciertos factores tales como la humedad, tiempo de contacto entre superficies, grado de presión y características hidrofóbicas/hidrofílicas de las superficies están probablemente asociados a grandes incrementos del grado de transferencia. En el caso de la humedad y presión, su incremento, además, reduce las diferencias en transferencias debidas al tipo de microorganismo. Por el contrario, la mayor duración del contacto entre superficies hace que existan diferencias más significativas en cuanto al tipo de microorganismo.

La información generada en el presente trabajo podría ser de gran aplicación en la confección de recomendaciones, guías o programas educativos relacionados con las prácticas de higiene de los manipuladores. La eliminación de los factores de riesgo, identificados aquí, durante la manipulación de los alimentos, podría reducir la incidencia de los fenómenos de transferencia bacteriana.

Finalmente, destacamos la importancia de usar datos cuantitativos para modelar la transferencia bacteriana. Debido a su alta variabilidad, los modelos probabilísticos parecen ser los más adecuados para representar la transferencia microbiana. La inclusión de estos modelos en estudios de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM) puede ayudar a obtener estimaciones más completas, y a considerar los fenómenos de transferencia bacteriana en los procesos de toma de decisiones basados en la ECRM.

El presente capítulo ha originado la siguiente publicación:

Understanding and Modelling Bacterial Transfer in Foods: A Review

Pérez-Rodríguez*, F., Valero, A., Carrasco, E., García, RM^a. and Zurera, G.

Department of Food Science and Technology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, C-1, 14014 Córdoba, Spain

Trends in Food Science and Technology, submitted

Understanding and Modelling Bacterial Transfer in Foods: A Review

1.1 Abstract

Bacterial transfer events are considered to be an important cause of transmission of food-borne diseases. In this review, the most common ways of bacterial transfer to food are studied, concluding that high levels of moisture, contact time and pressure could result in higher transfer between surfaces. From a risk management approach, this means that the identification and elimination of certain tasks or activities involving higher levels of these factors could be helpful to prevent bacterial transfer. Besides, mathematical bacterial transfer models from literature are analyzed, highlighting the use of transfer rates distributions to model bacterial transfer in a probabilistic Quantitative Microbiological Risk Assessment (QMRA) framework.

1.2. Introduction

The well-established UK surveillance system reported that cross contamination was the main contributing factor (32 %) in the outbreaks investigated in the period 1999-2000 (WHO, 2003). Likewise, the Center for Diseases Control (CDC) reported that 18 and 19 % of food-borne diseases caused by bacteria in the years 1993-1997 in the United States were associated with contaminated equipment and poor hygiene practices, respectively (CDC, 2000). Moreover, although most outbreaks result from extensive growth, insufficient cooking, etc, many are also associated with bacterial cross-contamination/recontamination (Roberts, 1990). Similarly, various authors have stated that cross contamination of bacterial and viral pathogens in homes and in food-service establishments can probably be the major contributing factor for sporadic and epidemic food-borne illnesses (Beumer and Kusumaningrum, 2003 ;Bloomfield, 2003, Chen, Jackson, Chea, and Schaffner, 2001). Therefore, it is apparent that pathogens transfer to foods through many different type of events such as recontamination, cross contamination, etc. which may be determinant factors in many of the outbreaks studied.

Nevertheless, there appeared to be a lack of epidemiological information about common contamination routes and sources as shown by Reij, den Aantrekker and ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology (2004). This is mainly derived from two important factors: the inherent difficulty to inquire into the contamination source in the outbreaks and the fragmentation of the information. Indeed, the reports do not usually provide clear and understandable information on contamination routes and contributing factors (Panisello, Rooney, Quantick and Stanwell-Smith, 2000). In some cases, terminology is misused, i.e. use of overlapping, non-standardised or very general terms (e.g. contaminated equipment, environmental contamination, contaminated handlers, etc.).

Cross contamination is frequently proposed as a general term which refers to the transfer, direct or indirect, of bacteria/virus from a contaminated product to a non-contaminated product. Also, other terms have been used to refer to bacterial transfer,

but not in a general sense, such as recontamination (food contamination after an inactivation process), poor hygiene handlers, contaminated equipment, etc. In this paper, the term transfer is proposed as a generic term which can be extended to refer to 3 specific transfer ways: Air-to-food (AF); Surface-to-food in fluids (SFF); and Surface-to-food by contact (SFC).

The AF transfer occurs through dust particles or via aerosols (den Aantrekker, Boom, Zwietering and van Schothorst 2003, and Muller, 1980) especially during the preparation and packaging of products (Reij et al., 2004, and Burfoot, Brown, Xu, Reavell and Hall, 2000). In these cases, the contamination levels reached in the product can be similar to other transfers such as hand-to-product transfer (SFC) (den Aantrekker et al. 2003). However, the non-inexistence practically of attendant outbreaks, and the low incidence and/or viability of pathogens in the air (Hughes, 2003 and, Eisel, Linton and Muriana, 1997) suggest low impact on food-borne diseases (Reij et al. 2004).

Regarding SFF transfer, bacteria in aqueous environments and suitable conditions tend to form biofilm on surfaces (pipelines, tanks, etc) (Characklis and Marshall, 1990). In these cases, the standard cleaning and sanitation procedures used in the food industry are not totally effective in eliminating biofilms (Bremer, Fillery and McQuillan 2006; Chavant, Gaillard-Martinie and Hébraud, 2004; Joseph, Karunasagar, Karunasagar, 2001; Leriche, Chassaing and Carpentier, 1999). Thus, when parts of these structures are released into fluids, bacterial transfer to food (milk, juices, sauces, purees) can occur, causing cross contamination or recontamination events. This type of transfer is a well-recognized contamination source in the food industry, e.g. in pipeline systems of dairy factories (Oliver, Jayarao, and Almeida, 2005, Flint, Bremer and Brooks, 1997; Koutzayiotis, 1992), leading, when occurring, to large outbreaks. An example of this is the last outbreak of *Salmonella* occurred in Spain with more than 2138 cases. This was caused by consumption of pre-cooked chicken contaminated by *Salmonella Hadar* which was found in a bend of the pipelines system (transporting gravy) of the factory (HPA, 2005).

The SFC transfer can occur in a wide variety of ways and situations: through contact with raw food, equipment, pets, pathogen carriers, cutting boards, dishcloths, food handlers, etc; and at different phases in the Food Chain (the food industry, retail, restaurants and homes) (Haysom and Sharp, 2005, De Jesús, Olsen, Bryce and Whiting, 2004, Martinez-Gonzales et al 2003, Lundén, Autio and Korkeala, 2002, Ollinger-Snyder and Matthew, 1996, Hudson and Mott, 1993). Moreover, SFC transfer has been reported to be a very important contributing factor in the food-borne illnesses originated at home (Beumer and Kusumaningrum, 2003, Bloomfield, 2003, Bloomfield and Scott, 1997). This is expected since it is well-reported that consumers usually fail to handle and prepare food in a hygienic manner (Gillespie, O'Brien and Goutam, 2001). In conclusion, further knowledge on this transfer type could help in the reduction of food-borne illnesses and in the development of effective hygiene practice. This review tries to gather recent information about SFC transfer in order to provide researchers the basis to be able to develop new investigations. Thus, the review will show the different experimental approaches carried out to investigate the phenomenon, highlighting advantages and drawbacks of each one. Conclusions are

extracted from studies to give a brief description about which factors are governing the phenomenon and how. Finally, a critical analysis of the mathematical transfer models published is presented and some alternatives are suggested in a quantitative microbiological risk assessment (QMRA) framework.

1.3. Investigating Bacterial Transfer

1.3.1. Types of studies

Traditionally, most studies on bacterial transfer have been presented in medical publications due to the important role that bacterial transfer plays in infections acquired in hospitals (Avila-Aguero, German, Paris and Herrera 2004, Weber and Rutala, 1997, Haynes Jr. and Hench, 1965). However, only recently transfer events have gained attention in food environments (foods, hands, stainless steel surfaces, air, fluids etc.) which has led researchers to study and quantify the phenomenon.

Studies on bacterial transfer can be sorted out into two groups based on the degree of experimental control. First, there are those that provide a great degree of control and, therefore, are useful for gaining insight into bacterial transfer phenomenon through detailed information about specific processes and factors affecting bacterial transfer. These studies design a very controlled experimental model in laboratories in which factors important in bacterial transfer are controlled (pressure, contact area, moisture level, temperature, time contact, personnel training, etc.). Studies by Vorst et al. (2006) and Kusumaningrum, Riboldi, Hazeleger and Beumer (2002) can be a clear example of this type of works.

On the other hand, studies can be performed closer to real environmental conditions, regardless of those factors and processes influencing transfer (i.e. factors are not controlled). These are focused on quantifying bacterial transfer events frequency and transfer rates as well as identifying contamination routes in real environments such as factories, food services, domestic kitchens, etc. For instance, studies by Lubber et al. (2006), De Jesus et al. (2004) obtained transfer rates for *Campylobacter* during handling in kitchen and *E. coli* from flies, respectively. Besides, Chen et al. (2001), Montville et al. (2001) performed experimental models to pick the random nature associated with bacteria transfer during food handling by different workers. Gorman, Bloomfield and Adley (2002) evaluated the cross contamination events that occurred during domestic preparation of chicken naturally contaminated with *Salmonella* spp., *Campylobacters* spp., *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. Results showed that the drain site was the most frequently contaminated site. Also, the total frequency of occurrence of cross contamination for *Campylobacter* spp. was 18 %, *Salmonella* spp. 16.6 %, *E. coli* 9.5 % and *S. aureus* 19.7%. As a conclusion, the study evidenced the ability of these pathogens to disseminate from contaminated raw foods to hands and to food contact surfaces in domestic kitchens. Moreover, the results are helpful to identify the most abundant pathogens, contamination routes and reservoirs. Similarly, the study by Mattick et al. (2003) developed 5 different experimental scenarios which simulated diverse transfer routes occurring in domestic kitchens during the washing-up of soiled dishes and food preparation. This study showed the ability of *E. coli* and *Salmonella* spp. to be transferred through sponges

and contaminated dishes to foods in domestic kitchen. Other similar studies are as follows: Haysom and Sharp (2005 and 2004), Redmond, Griffith, Slader and Humphrey (2004), Kishimoto et al. (2004) who also evaluated also the facility of different microorganisms to be transferred to foods in different handling scenarios.

An important difficulty arises when we try to study bacterial transfer event is that there are many factors could be influencing our results (i.e. transfer events); in addition, it is likely that some of factors are still unknown. Experiments under strict control enable us to study and identify those factors influencing bacterial transfer. Nevertheless, they can not account for the combined effects of factors (unknown and known) that occur in a real and complex system. Therefore, it is desirable to jointly combine results generated in controlled experimental models and information from field studies (i.e. studies developed in more real conditions). This would lead to a better understanding of bacterial transfer events. Further, by using data from field studies, findings obtained from the first type of studies can be validated. Finally, data from both types of studies can be an important source of information (quantitative and qualitative) for Exposure Assessment (bacterial transfer models), Risk Management and in the development of consumer risk communication strategies.

1.3.2. Recovery methods: limitations and alternatives

There is a multitude of available methods to quantify bacterial transfer between surfaces. Destructive methods as excision and scratching are the most efficient recovering systems (Palumbo, Klein, Capra, Eblen, and Millar, 1999), although they are only applicable on soft materials such as foods and some cases on wood. The most popular non-destructive method is the swabbing method which is frequently applied in the food industry to assess the effectiveness of the cleaning and disinfection procedures. Generally, this consists of, firstly, stroking the surface using a swab (according to a determined protocol), then streaking it or snapping in a sterile extracting solution (peptone water; 0.8% saline solution; phosphate buffer solution) and vortexing it to release the bacteria from the bud into the extracting solution (Davidson, Griffith, Peters and Fielding, 1999). Finally, the bacteria suspension is enumerated by plating. The composition of the swab's tip varies according to the commercial brand. The most frequently used material is cotton, although alginate calcium is reported by some authors as a more effective compound to collect bacteria from solid surfaces (Higgins, 1950). In spite of its wide use in transfer studies (Montville et al., 2001), the swabbing method poses certain drawbacks that should be taken into account by researchers. For instance, Yamaguchi, Ishidoshiro, Yoshida, Saika, Senda and Nasu (2003) reported low reproducibility because of variation among individual operators, a fact mainly associated to the different pressures applied by operators during stroking. Regarding recovery capacity, Bredholt et al. (1999) and Angelotti, Foter, Busch and Lewis (1958) reported that only a small proportion of the total bacterial population present on a surface could be recovered. Also, Foschino, Picozzi, Civardi, Bandini and Faroldi (2003) and Davidson et al. (1999) reported low recovery rates, being higher when wet surfaces were used (~0.1 - 8.8 %). By contrast, Moore and Griffith (2002) suggested that the swabbing method is able to remove a significant proportion from dry surfaces. These findings can

probably be explained by the fact that bacteria collected in the tip matrix can not be released easily (Salo, Laine, Alanko, Sjöberg and Wirtanen, 2000). Hence shaking procedures should be used to facilitate bacteria detaching from the swab.

Another type of recovering method that is widely used in transfer studies is the agar stamp method (dipslide, Rodac plate, etc.): the agar is pressed directly onto the surface to be sampled. This method is much more sensitive at low counts than the swabbing method, e.g. Foshino et al. (2003) reported recovery rates of 80 % and 1 % for *Escherichia coli* by using the Rodac plate method and the swabbing method, respectively; although, as a drawback, this can only be applied on flat surfaces. Besides this, factors such as contact time and pressure levels should be optimized during experimentation, if one wants to obtain better recovery rates (Yamaguchi et al., 2003).

When the agar stamp is applied to surfaces with high inoculum, bacteria microcolonies on the surface are likely to be identified as individual colonies in the agar underestimating thus the number of bacteria on surfaces. For this reason, many authors suggest, on the one hand, using the agar stamp exclusively for flat surfaces and not highly inoculated surfaces, and on the other hand, using the swabbing method for irregular surfaces and high inoculum. However, there are exceptions, Kusumaningrum et al. (2002) demonstrated that contact agar plates can be utilized at relatively high inoculum levels (10^3 - 10^7 CFU/100 cm²), obtaining high recovery rates (50-60%) if the agar is homogenized in a sterilized broth such as peptone water, then the bacterial content is enumerated. In the case of soiled surfaces and/or biofilm formation, mechanical action (scraping/abrasion) is necessary to remove the organic matter where bacteria are entrapped, so swabbing should be applied instead of agar stamp methods. Since both methods are complementary, many transfer scenarios could be studied by using the above methods alone or in combination as shown by Tebbutt (1991).

Summarizing, some analytical problems still remain because a standardised contamination of a solid material with a viable microbial population and its proper determination is not easy to perform (Palumbo et al., 1999, Dorsa, Cutter and Siragusa, 1996, Fliss, Simard and Ettriki, 1991). In this sense, Moore and Griffith (2002) stated that various methods of bacterial enumerating surface of contamination exist although there is no consensus as to an accepted standard. Besides, the manual skill of operators and the technique of recapture affect greatly the accuracy and the repeatability. In addition, the results are often not meaningful when the cell concentration on the surface is low (Bloomfield, Arthur, Van Klingerren, Holah and Pullen, 1994 and Bellon-Fontaine and Cerf, 1991).

Some alternatives could be proposed on the basis of a better recovery rate and repeatability: sonication, vortexing and epifluorescence are increasingly used to investigate the reduction or increment of bacterial population on surfaces (Chantarapanont, Berrang and Frank, 2003). Sonication and vortexing in a microbial broth, is a well-documented method to remove cells from small surfaces. Yan, Todd, Ryser (2005) studied the recovery capacity for sonication, vortexing alone and vortexing with sterilized crystal beads for *Listeria monocytogenes* on two different conveyor belt pieces. All showed similar numbers of *Listeria* except for one type of

conveyor in which vortexing alone resulted less effective than the others remaining. Similarly, Wilks, Michels, and Keevil (2005) showed 100 % recovery when the stainless steel coupons were vortexed with beads in a microbial broth. Epifluorescence microscopy is other alternative to the classical methods (swabbing and the contact plate) enumerating bacteria directly on surfaces. This method offers some advantages when compared to classical methods. Firstly, meaningful results, with high accurate and precision, can be obtained at low counts since the enumeration is carried out directly on the surface containing bacteria, in addition, based on the biochemical properties of cells and the use of specific fluorochromes, this can provide information on the physiological state of bacteria on the surface (Alive/dead, esterase activity, etc.) (Bredholt et al. 1999). Automation of this process via image-analyzing systems would further facilitate the application of this method on transfer studies.

1.3.3. Microorganisms

In many cases, surrogate microorganisms are used due to pathogen manipulation which could lead to certain risk levels for experimenters. For instance, Chen et al., 2001 used *Enterobacter aerogenes* since the attachment characteristics were similar to *Salmonella* spp. which was already shown by Zhao, Zhao, Doyle, Rubino and Meng (1998). In addition, resistance ability against antibiotics is used to avoid the interference of background flora in the enumeration of the studied microorganisms (Watchel, Mcevoy, Luo, Campbell and Solomon, 2003; Chen et al., 2001 and Montville et al., 2001).

1.3.4. Transfer measure: transfer rate (TR)

The transfer data obtained can be expressed by means of transfer rates (Chen et al., 2001), defined as the percentage of cells transferred from the donor surface to the recipient surface, which can be written as follows:

$$TR = \frac{\text{CFU recipient}}{\text{CFU donor}} \times 100$$

In this manner, the TR can be expressed “per surface units” (e.g. cm²) when a sampled area is known or simply “per fomite” (the total bacteria number recovered from the recipient surface after the transfer event) when the area is unknown or difficult to estimate. Besides, Moore, Sheldon and Jaykus (2003) pointed out that data for the donor surface (CFU donor) can be taken either from surfaces already involved in the transfer event or from control surfaces with the same inoculum quantity not used for the transfer assay (Vorst et al. 2006; Kusumaningrum et al. 2002; Dickson, 1990). According to these authors, the former would be less preferable as the recovery efficiency is not validated. To validate it, they propose to use this simple formula (Moore et al., 2003):

$$\log \text{ ratio} = \frac{\text{Log (CFU donor + CFU recipient)}}{\text{Log (CFU control)}}$$

If the log ratio value is significantly low, it means that there is a low recovery efficiency or a great decrease in bacteria during incubation time due to environmental stress. If this is not taken into account, the TR obtained could underestimate the transfer ability. Thus, to resolve it, a percentage-basis or baseline could be applied to calculate the TR (Bidawid, Malik, Adegbunrin, Sattar and Farber, 2004). Firstly, a baseline is obtained through the following formula:

$$\text{Baseline} = \frac{\text{CFU control after drying}}{\text{CFU control at time 0}}$$

And then, by using the baseline as the actual inoculum on the donor surface, the TR is calculated as follows:

$$\text{TR} = \frac{\text{CFU recipient}}{\text{Baseline}} \times 100$$

1.4. Factors Governing Bacterial Transfer

It is generally known that the transfer ability is strongly linked to bacterial attachment (i.e. attachment force on surfaces). Nevertheless, theoretically speaking, factors affecting bacterial transfer may be divided into two groups: environmental and intrinsic factors (Figure 1).

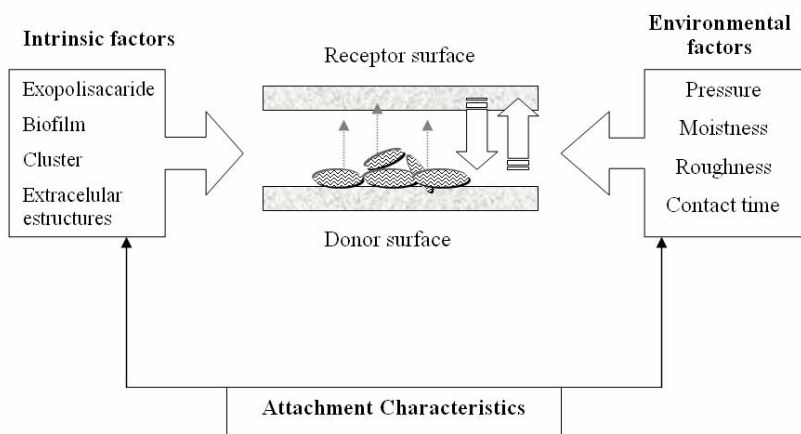


Figure 1. Schematic of bacterial transfer processes by contact between surfaces. Environmental and intrinsic factors governing bacterial transfer are included.

The first group refers to the physical-chemical properties of the surface material and biofouling layer, moisture, pressure, and contact time. The second group includes factors related to bacterial species such as the producing-capacity of exopolisaccharide; biofilm formation, clump formation and the presence of extra-cellular structures (*curlis* and *fimbriaes*).

1.4.1. Environmental factors

Differences in the types of surfaces can be significant in bacterial transfer. Thus, studies usually agree in the importance of fat/lean and moisture content in bacterial transfer (Luber et al., 2006, Vorst et al., 2006, Kusumaningrum et al., 2002 and Dickson, 1990). Data regarding fat/lean content show that contact with contaminated higher fat content foods lead to a lower transfer rate when compared with higher lean content surfaces. From a general point of view, this could be explained by the fact that bacteria with hydrophobic properties tend to better adhere to hydrophobic material surfaces (rubber, PVC, fat meat, etc.) thus reducing the number of bacteria available for transfer (Sattar et al., 2004, Foong and Dickson, 2004; Dickson and Koohmaraie, 1989; Chung, Dickson and Crouse, 1989). Conversely, bacteria with hydrophilic characteristics better attach to hydrophilic surfaces (e.g. stainless steel, lean meat, etc.), and therefore, in these cases, the transfer capacity would be lower. A paradigmatic case is that depicted by *S. aureus* (hydrophilic) in the study by Knobben, Van der Mei, Van Horn and Busscher (in press). They reported that *S. aureus* transferred to hydrophilic surfaces very easily, but then, because of strong attachment, it transferred worse to other materials. In this respect, the data indicate that hydrophobicity/hydrophilicity properties of both donor and recipient surfaces could contribute significantly to bacterial transfer, although it seems that donor surfaces exert a major and clearer effect (Knobben et al. in press, Vermeltoort, van der Mei, Busscher, Hooymans and Bruinsma, 2004). In addition, note that the presence of organic material, or biofouling on surfaces could modify original physical-chemical characteristics of inert surfaces (stainless steel, rubber, etc.), thereby attachment and bacterial transfer (Absolom, Lamberti, Policova, Zingg, van Oss and Neumam, 1983). In fact, data show that surfaces with different initial properties become similar (hydrophilic) when these are covered with food exudates (Midelet and Carpentier, 2002).

On the other hand, it is also likely that foods with high lean content support a better transfer between surfaces than foods with high fat content because of higher moisture associated to lean tissue (Dickson, 1990). Thus, more moisture could yield looser attachment on tissue, and consequently, a higher bacterial transfer. Similarly, it has also been proven that additional moisture facilitates the transfer from contaminated stainless steel (Moore et al., 2003 and Kusumaningrum et al., 2001), fabrics (Sattar et al. 2001, Marples and Towers, 1979) and hands (Merry, Miller, Findon, Webster, and Neff, 2001). Moreover, it has been demonstrated that bacteria can be transferred through gloves (Heal, Blom, Titcomb, Taylor, Bowker and Hardy, 2003; Montville et al., 2001), and that residual moisture on these enhances bacterial transfer (Blom, Gozzard, Heal, Bowker, and Estela, 2002; Gill and Jones, 2002, Patrick, Findon and Miller, 1997, Marples and Towers, 1997, Scott and Bloomfield, 1990, Mackintosh and Hoffman, 1984).

The surfaces topography can be another significant factor influencing bacterial transfer. Thus, studies often distinguish between smooth surfaces (e.g. stainless steel) and rough surfaces (e.g., rubber and PVC). Some studies reported that **bacterial attachment** depends on the degree of roughness; however, others found no differences between bacterial transfers at difference degrees of roughness (Flint,

Brooks and Bremer, 2000). The cause of this divergence could be in the differences in recovery methods and menstium used between studies. Conversely, **bacterial transfer** studies did reveal a clear correlation between roughness and bacterial transfer (Dawson, Han, Cox, Black and Simmons in press, Knobben et al. in press, Midelet and Carpentier, 2002): the higher the roughness, the lower the transfer; since bacteria colonize in the depressed areas on rough surfaces they are no longer in contact with the transfer surface, and therefore, they can not be transferred. These results refer exclusively to donor surfaces; regarding recipient surfaces, there are some data that would also suggest that roughness in these could influence bacterial transfer, although less than donor surfaces (Dawson et al., in press, Vermeltfoort et al., 2004). Moreover other data would indicate that rough recipient surfaces could favour transfer when friction is applied (Knobben et al. in press). Regarding the porosity degree on surfaces, it can be observed that porous surfaces (clothes, aprons, sponges, etc.) show lower rates when compared to non-porous surfaces (stainless steel, knobs, etc.) (Rusin, Maxwell and Gerba, 2002, Kusumaningrum et al., 2002, and Scott and Bloomfield 1990). However, in this case, although apparently less risk could be associated to transfer from fabrics, the fact is also remarkable that the residual water accumulated in clothes and sponges would enable bacteria to survive for longer periods, and consequently, bacterial transfer events could also be prolonged (Bloomfield, 2003). Besides this, corrosion and scratches (consequence of repeated use and cleaning) are other factors that influence bacterial transfer, since major corrosion or scratches on surfaces facilitates accumulation of bio-fouling where bacteria can be embedded or trapped, thereby resulting in lower bacteria available for transfer. However, because of this, bacteria are better protected from environmental stress which leads to more extended transfer time. In this respect, although bacteria are firmly attached to depressed areas or scratches on surfaces, certain factors such as additional moisture could make bacteria be loosely attached, leading to high bacterial transfer when contacting surfaces. This fact, therefore, highlights the importance of performing adequate cleaning and disinfection procedures as a means to prevent bacterial transfer events to food. Nevertheless, it should also be noted that these procedures become less effective when the surface presents corrosion or scratches.

With regard to the pressure effect, the study by Vorst et al. (2006 and 2004) evidenced an apparent positive effect of this factor on bacterial transfer, which is also consistent with the findings from Kusumaningrum et al. (2002). Moore and Griffith (2002) also demonstrated that the recovery from stainless steel increased with mechanical energy. In essence, high pressures would yield lower distances between surfaces enabling thus the setting of unions and interactions between surface/biofouling layer and bacteria.

Based on the mechanism of bacterial adhesion proposed by Bower et al. (1996), we can hypothesize that the increase in pressure provokes surfaces to be closer, avoiding the initial repulsion forces (50 nm in distance) and enabling binding forces (20 nm in distance) and more specific interaction (< 1.5 nm in distance). However, another mechanism can also explain the pressure effect on transfer: the pressure or contact force between surfaces can mechanically release residues containing entrapped bacteria, producing thus transfer to the other contact surface. In this

respect, it is important to consider the direction of the force friction (Knobben et al. in press, Sattar et al., 2001), surface profile, contact time, etc.

Regarding the effect of contact time, there is very limited information. Recently, Dawson et al. (in press) found that the transfer rate increased as the contact time increased, although this was observed only when the inoculum on the surface was incubated for 8 hours or more. Dickson (1990) suggested that the longer the contact time, the higher the number of unions and interactions could occur. Indeed, according to attachment studies, bacterial attachment increased with longer time (Guðbjörnsdóttir, Einarsson, and Thorkelsson, 2005).

1.4.2. Intrinsic factors (specie)

The effect of inoculum size was studied by Montville and Schaffner (2003); the study concluded, after 352 observations, that the inoculum size had a statistically significant effect on transfer efficiency. They observed a strong negative linear trend between inoculum on source and transfer rate for almost all data. "When the population of bacteria on the source surface was high, the percent transfer was relatively low. Where the population on the source surface was lower, the percent transfer tended to be higher." These authors suggested that the same effect could be observed in other studies (Rusin et al., 2002, Mackintosh and Hoffman, 1984). The influence of the inoculum size on attachment strength evidenced by other authors is proposed as a possible explanation. In our opinion, another factor that explains this phenomenon could be the clump size. Sommer, Martin-Rouas, and Mettler (1999) demonstrated that for biofilms of *Pseudomonas* spp. with high adherent populations, the microcolonies were small, but rare and wide for low adherent populations. This fact by itself could explain why the low initial inoculum would yield a higher percentage: the transfer by contact between surfaces of the same number of microcolonies, bigger for low inoculum levels and smaller for high inoculum levels, would lead to higher transfer rates for the former as the total number of individual cells transferred would be greater. Also, it has been reported that clumps are more difficult to be transferred than non-grouped cells (Tebbutt, 1991; Scheusner, 1982). However, such a hypothesis should be studied and confirmed through more specific experiments and with a larger number of microorganism species.

Several studies have reported that transfer ability is dependent on bacterial specie (Knobben et al., in press, Midelet, Kobilinsky and Carpentier, 2006, Midelet and Carpentier, 2002) which is probably related to the difference in attachment characteristics between bacterial species. Furthermore, other factors related to bacterial species, were proven to be significant in bacterial transfer (e.g. preculture conditions, disinfection treatments, mixture cultures, etc.). Contrarily, results from Kusumaningrum et al. (2002) evidenced that in some cases bacterial species could not be significant in bacterial transfer. In this study, bacterial transfer to a roasted chicken fillet (handled with or without pressure) and to a cucumber slice with pressure did not depend on the bacterial specie (*S. aureus*, *S. enteritidis* and *C. jejuni*), but it did when the cucumber was handled without pressure. On the other hand, in this same study, a significant difference was found when a more controlled experiment was performed which consisted of press contact agar against contaminated surfaces

and applying a 500 g weight. This latter experiment was similar to those performed by Midelet, et al. (2006) and Midelet and Carpentier (2002), though these works were performed by using bacterial populations in biofilm. Data seem to suggest that in some cases, the specie effect could be cancelled out, due to environmental factors with a more important effect on bacterial transfer (pressure, moisture, etc.). Thus, to explicate the different results from Kusumaningrum et al. (2002), we could hypothesize that combinations of high moisture and pressure (500 g) could facilitate the bacterial detachment, thus reducing the difference between species and equalling transfer ability. In addition, Vermeltfoort et al. (2004) found that the specie factor did not influence transfer as a single factor but it did when combined with contact time. In conclusion, contact time, when increased, enhances possible differences between species due probably to differences in attachment processes such as the producing-capacity of exopolisacaride, the presence of extra-cellular structures, etc. In turn, moisture and pressure, if high, reduce differences between species; in the first case due to the fact that attachment is weakened by the moisture present and the second one because of the bacteria embedded in organic material are easily removed by high pressure and friction. From an experimental point of view, this implies that for some scenarios or tasks involving high moisture levels and pressure, microorganisms with different attachment characteristics could be indistinctly applied to obtain transfer rates. Nevertheless, further studies will be needed to clarify the specie effect on bacterial transfer and identify the environmental factors governing bacterial transfer. Experimental models developed in more controlled environments would enable us to isolate the effect of every factor more clearly. As an example, the use of agar-based surfaces to mimic food surfaces allows the control of factors affecting bacterial transfer such as nutrients, moisture, texture, area, etc. (Veulemans, Jacqmain and Jacqmain, 1970 ; Midelet, et al., 2006).

1.4.3. By identifying the determinant factors, risk can be located and reduced

According to the previous section, it can be stated that high levels of moisture, pressure and contact time increase bacterial transfer. From a risk-based approach, it can also be said that, control on these environmental factors can be an interesting way to reduce the risk derived from bacterial transfer. For instance, by drying wet surfaces after handling products or reducing the time that foods are in contact with work surfaces could be a means of reducing bacterial transfer.

Besides this, by assuming that each type of task can be associated to a specific level in those factors (moisture, contact time, pressure, etc.), we could state that certain transfer patterns (i.e. high, medium or low transfer) would be further linked to certain tasks or scenarios than to others. For instance, scenarios corresponding to the handling with wet gloves (e.g. handling raw meat and fresh produce or washing gloves for reuse) are associated with higher transfer to hands, and consequently, to higher risk (associated to subsequent tasks performed with bare hands). This fact is also supported by data shown in this review and has also been suggested by other authors (Rusin et al., 2002.). Accordingly, it is logical to think that there can be certain tasks or scenarios which are more likely than others to lead to cross contamination events. This information, when considered, could help risk managers focus on those

foods, practices, and factors which suppose higher risks of bacterial transfer, thereby proposing more effective and useful recommendations or control measures. Thus, coming back to our example, it is reasonable to recommend that hands should be washed even when gloves have been used. Nevertheless, further knowledge on how factors affect bacterial transfer could be useful to propose safer alternatives in handling foods, recommending the elimination of those factors that increase bacterial transfer.

1.5. SFC Transfer Models

1.5.1. General view

To date, few QMRA's studies have included mathematical models describing bacterial transfer between surfaces (Pérez-Rodríguez, Todd, Valero, Carrasco, García and Zurera, 2006; Yang, Mokhtari, Jaykus, Morales, Cates and Cowen, 2006; Kusumaningrum, Van Asselt, Beumer and Zwietering, 2004; Schaffner 2004; Rosenquist, Nielsen, Sommer, Norrung and Christensen, 2003). Most of them are based on the application of the equation $TR(\%)/100 \cdot N$ (cfu), through which one can estimate the number of bacteria transferred.

den Aantrekker et al. (2003) proposed a simple scheme for a bacterial transfer model based on 3 elements: a contaminated source; an intermediate phase (contaminated equipment, utensils, hands); and finally the food, which comes into contact with the intermediate phase and is contaminated. In this general scheme, the TR is used to describe the transfer ratio through the different elements.

Unlike others types of phenomenon such as bacterial growth and death, bacterial transfer events does not give rise to an exponential increment of bacteria in food but also a linear one. In other words, in the above equation, the TRs should be applied to arithmetical values of concentration (cfu), and not to log-transformed ones (log cfu) as one would do in the case of growth or inactivation models. For instance, if 1 log cfu/cm² is transferred to a surface contaminated with 2 log cfu, the final concentration would be $100 + 10 = 110$ cfu/cm² and not $2 + 1 = 3$ log cfu/cm² as expected for a growth or inactivation process.

The TR often shows a large variation as a consequence of the ample number of factors involved, and also, of the experimental error derived from sampling and enumeration techniques typically applied in transfer studies. Indeed, a same transfer scenario could result in different transfer levels when repeated (Kusumaningrum, et al., 2004, Chen et al., 2001, Montville et al., 2001). Therefore, probability distributions should be used to capture the uncertainty and variability inherent to the TR data. An example of the usage of TR distributions in quantitative exposure assessment is the study carried out by Perez-Rodriguez et al. (2006) who modelled transfer of *L. monocytogenes* from a contaminated raw meat product to a cooked meat product using TR distributions taken from other studies (Chen et al., 2001 and Montville et al., 2001). As the model used probability distributions, Monte-Carlo analysis had to be applied to perform the necessary calculations. Most studies have used similar methodologies to model bacterial transfer between surfaces. Figure 2 depicts how

calculations are performed with TRs in a probabilistic context on the basis of the scheme proposed by den Aantrekker et al. (2003), mentioned previously.

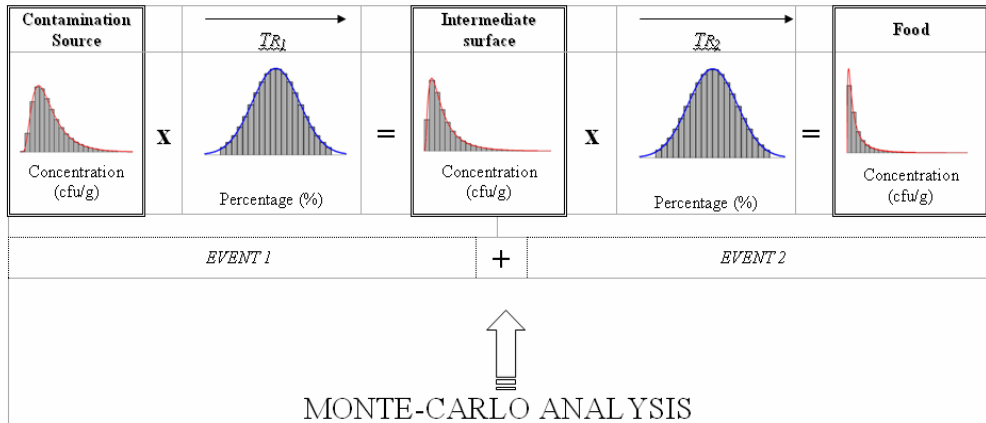


Figure 2. Probabilistic bacterial transfer model based on the application of TRs distributions. TR_1 is multiplied by the concentrations distribution for the contamination source resulting in the number of bacteria transferred to the intermediate surface (1). Then, TR_2 is multiplied by the concentrations distribution for the intermediate surface, obtaining the number of bacteria transferred to food (2).

On the other hand, many times, the contact between surfaces (at least one contaminated) could result in no bacterial transfer (i.e. failed bacterial transfer events) which occurs especially at low inoculum levels (Luber et al., 2006; Vorst et al. 2006 and Watchel et al. 2003). What is more, concentrations on surfaces in the real world are typically associated with low or very low levels. This fact would suggest that failed bacterial transfer events could be more frequent than expected. An interesting way of modelling this aspect would be by means of TR distributions including also 0 % transfer values. However, there are not sufficient data available in literature to develop this approach because transfer works are more interested in studying successful transfer events (> 0% transfer data) than failed transfer events (i.e. 0 % transfer data). To solve this, bacterial transfer models developed by Yang et al. (2006) and Schaffner (2004) applied cross contamination frequency values (based on surveillance studies or expert opinion) and TRs to describe prevalence and concentration changes, respectively. On the other hand, Ariza, Mettler, Daudin and Sanaa (2006) in its compartmental and dynamic cross contamination model for mechanical smearing of cheeses took an interesting approach to modelling bacterial transfer based on the concept that bacterial transfer and biomass transfer are similar processes. Thus, by assuming that microorganisms are distributed homogeneously throughout food, they could apply a binomial distribution $B(n, p)$ to describe bacterial transfer between different compartments, p being the transfer probability and n the number of bacteria in the compartment. The binomial parameters were obtained from experimental data and simulated in a probabilistic model. In line with this approach, Perez-Rodríguez, Valero, Carrasco, García-Gimeno and Zurera 2005 suggested that the TRs obtained

from transfer studies could also be interpreted as the probability of one cell being transferred (p), and therefore, these could also be used as the parameter p in a binomial distribution. This probabilistic model can also explain 0% transfer events (prevalence changes) when p and/or n become very small (see Figure 3). Nevertheless, if is not assumed homogeneous distribution of bacteria (e.g. cluster formations) another type of distribution should be used instead of the binomial. Further studies, especially, at low inoculum are necessary to generate new data to help in bettering the modelling of bacterial transfer considering the effect on concentration and prevalence.

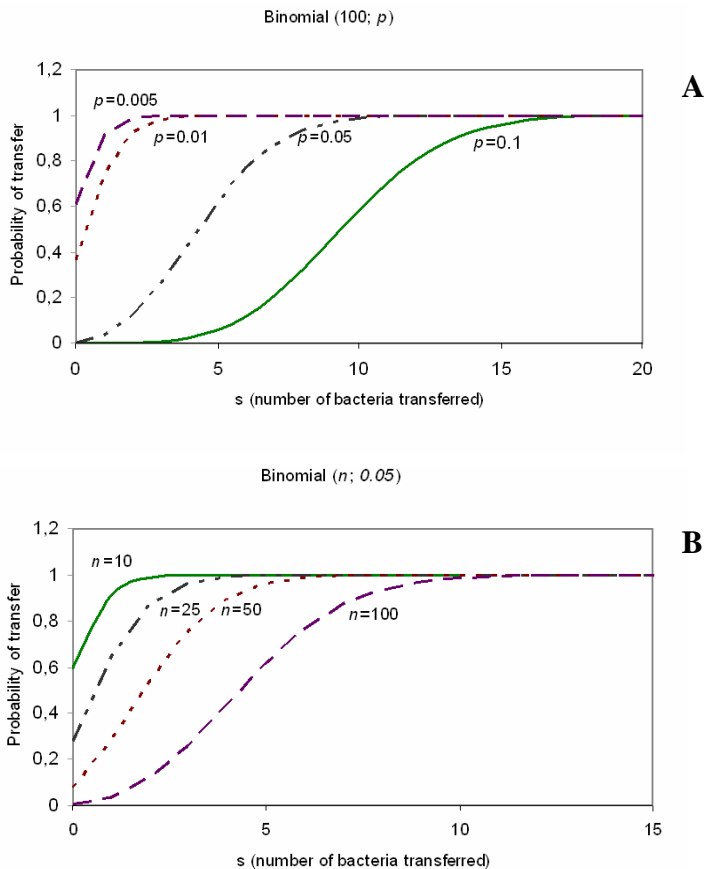


Figure 3. Binomial distribution accounting for bacterial transfer which is defined by parameters p and n : the smaller is p (A) or/and the smaller is n (B), the higher is the frequency of failed bacterial transfer events ($s=0$ bacteria transferred).

1.5.2. Integrating bacterial transfer models in a QMRA framework

It is generally accepted that bacterial transfer by itself does not lead to high risk unless other contributing factors are present. Bacterial transfer models, therefore, need to be applied together with other types of models, in a QMRA context (Figure 4). For instance, for opportunistic pathogens such as *L. monocytogenes*, the risk is significantly high only when the pathogen is linked to an extensive growth in homes

(Pérez-Rodríguez et al. 2007; Yang et al. 2006; FDA/USDA/FSIS, 2003). In these cases, it is necessary to apply growth models to know whether the initial concentration in food (e.g. due to bacterial transfer) could increase up to risk levels at the moment of consumption.

The practices and activities developed during manufacturing, preparation, and food handling could largely influence on how, how many, or when bacterial transfer events take place. To consider this aspect, factors such as contaminated area, contact frequency, washing frequency, etc. (Yang et al. 2006; Christensen et al., 2005; Ivanek, Grönh, Wiedmann, and Wells, 2004) should be modelled. Social factors or the age of handlers can also determine the way foods are handled, and consequently, bacterial transfer. In addition, its inclusion enables us to identify the handlers' attitudes associated potentially to bacterial transfer events. Summarizing, these types of models determine the potential number of bacterial transfer events in a specific scenario (cross contamination or recontamination cases), thus resulting in both prevalence and concentration changes for the microorganisms modelled (Figure 4).

It is generally known that bacteria on surfaces die due to environmental stress (dehydration, starvation, etc.). This fact, although obvious, could greatly determine bacterial transfer (Wilks, Michels and Keevil, 2006, Schaffner 2004). For instance, if a surface is contaminated with 3 log cfu/cm², and its reduction rate (due to environmental stress) is 1 log cfu/cm²h⁻¹, bacteria would decrease in time, so after 3 hours there would be no available bacteria to be transferred. In other words, the survival ability of microorganisms determines whether or not bacterial transfer takes place and the number of bacteria being transferred (see Figure 4). Hence, models not including survival models would overestimate the risk associated to bacterial transfer.

The predictions given by bacterial transfer models seem to be less precise and accurate than other types of models (e.g. bacterial kinetic models) (Pérez-Rodríguez et al., 2006). Further, it is difficult to perform validation processes due to the lack of quantitative data. In spite of this, models can be useful to identify both effective control strategies and factors affecting final risk. In addition, these provide valuable information in cases where there is a lack of epidemiological information or when it is difficult to develop experimental models. Examples of this are Ivanek et al. (2004) who developed an in-plant model for *Listeria* transfer to food using data obtained from a fishery factory, evaluating the impact of handling practices or FSIS, 2003 where it was evaluated the effectiveness of sanitation regimes and food contact surface sanitation testing at the plant and its impact on bacterial transfer and levels of *Listeria*. Results from these models could be helpful to choose effective practices and procedures, or, if necessary, preventive measures to reduce risk associated to bacterial transfer events (sanitation regimes, disinfection procedures, handling practices, sampling plans, etc.).

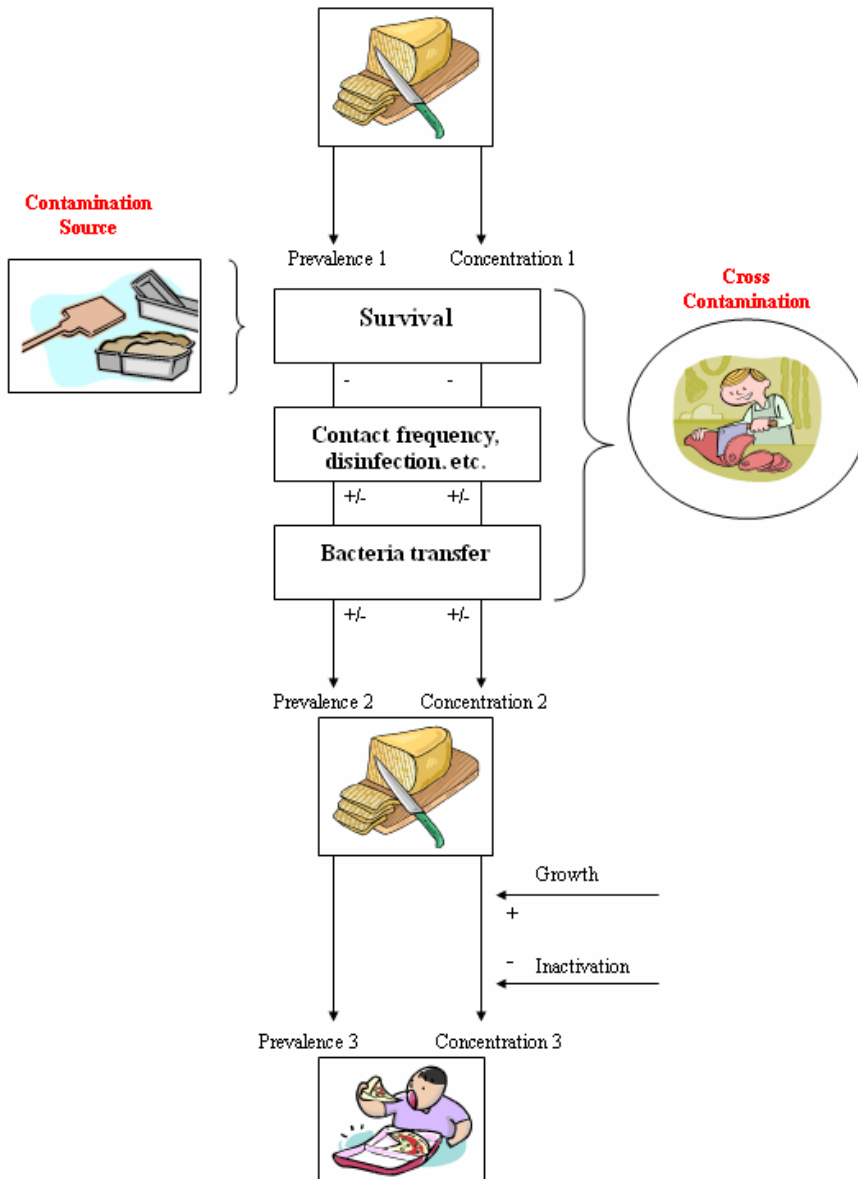


Figure 4. The diagram represents the prevalence and concentration changes in a cross contamination scenario including the impact of bacterial transfer, bacterial survival, and handlers' behaviour as well as growth and inactivation processes. The symbols +/- indicate increase or decrease effect, respectively on prevalence and concentration.

1.6. Conclusions

Advances in our understanding of bacterial transfer could be clearly benefited from an iterative approach that combines laboratory and field investigation. This information combined with mathematical models can be helpful to develop guides to good food hygiene. In this review, moisture, pressure and contact time have been

identified to be factors that increase SFC bacterial transfer. From a risk-based approach, this means that food practice involving reduction of these factors could contribute positively in reducing frequency of bacterial transfer cases to foods (i.e. cross contamination).

In our opinion, the main objective and challenge for modelling work about bacterial transfer is to develop reliable mathematical models capable of predicting, first, whether or not transfer (prevalence changes) takes place and second, what proportion of bacteria is transferred (concentration changes) in function of certain factors (pressure level, fat/lean content, moisture level, etc). However, with today's knowledge, such models are a Utopia, since information is imprecise and scarce, and data show a great experimental error. Hence, not only further insight in the mechanisms and factors involved will be necessary, but also, more precise and accurate microbiological methods should be developed and applied to transfer studies. Only through both achievements, suitable bacterial transfer models for QMRA could be obtained. Until that moment, the stochastic models, (i.e. probability distributions), seem to better fit the apparent random and imprecise nature showed by experimental data.

Acknowledgments

This work was partly financed by the MCYT AGL2005-119 and the Research Group AGR-170 HIBRO of the Plan Andaluz de Investigación (PAI).

1.7. References

- Absolom, D.R., Lamberti, F.V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C.J. & Neumam, A.W. (1983). Surface thermodynamic of bacterial adhesion, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 90-97
- Angelotti, R., Foter, M.J., Busch, K.A., & Lewis, K.H. (1958). A comparative evaluation of methods for determining the bacterial contamination of surfaces, *Food Res.*, 23, 175-185.
- Ariza, F., Mettler, E., Daudin, J., & Sanaa, M. (2006). Stochastic, Compartmental, and Dynamic Modeling of Cross-Contamination During Mechanical Smearing of Cheeses, *Risk Anal.*, 26, 731-745.
- Avila-Aguero, M.L., German, G., Paris, M.M., & Herrera, J.F. (2004) Toys in a pediatric hospital: Are they a bacterial source?. *American Journal of Infection Control*, 32, 287-290.
- Bellon-Fontaine, M.N., & Cerf, O. (1991). Mécanismes d'adhésion des micro-organismes aux surfaces: facteurs influent sur l'adhésion. *Industries Agro-Alimentaires*, 108, 13-17.
- Beumer, R.R., & Kusumaningrum, H. (2003) Kitchen hygiene in daily life. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 51, 299-302.

Bidawid, S., Malik, N., Adegbinrin, O., Sattar, S.A., & Farber, J.M. (2004). Norovirus Cross-Contamination during Food Handling and Interruption of Virus Transfer by Hand Antisepsis: Experiments with Feline Calicivirus as a Surrogate, *J. Food Prot.*, 67, 103–109.

Blom, A.W., Gozzard, C., Heal, J. Bowker, & Estela, C.M. (2002) Bacterial strike-through of re-usable surgical drapes: the effect of different wetting agents. *J. Hosp. Infect.*, 52, 52-55.

Bloomfield, S.F. (2003). Home hygiene: a risk approach. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 206, 1-8.

Bloomfield, S.F., & Scott, E. (1997). Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *J. Appl. Microbiol.*, 83, 1-9.

Bloomfield, S.F., Arthur, M., Van Klingerren, B., Holah, J.T., Pullen, W. & Elton, R. (1994). An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 86-94.

Bower, C.K., McGuire, J. & Daeschel, M.A. (1995). Suppression of *Listeria monocytogenes* Colonization following Adsorption of Nisin onto Silica Surfaces *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 992–997

Bower, C.K., McGuire, J., & Daeschel, M.A. (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends Food Sci. Tech.*, 7, 152-156

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

Bremer, P.J., Fillery S. & McQuillan, A.J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms *Int. J. Food Microbiol.*, 106,254-262.

Burfoot, D., Brown, K., Xu, Y., Reavell, S.V. & Hall, K. (2000). Localised air delivery systems in the food industry. *Trends in Food Sc. Tech.*, 11, 410-418.

CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2000). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks --United States, 1993-1997. Available at <http://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/ss4901a1.htm#tab27>. Accessed in 21st October, 2006

Chantarapanont W, Berrang M, & Frank JF. (2003).Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin. *J Food Prot.*, 66, 2222-2230.

Characklis, W.G. & Marshall, KC. (1990) Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: W.G. Charackhs and K.C. Marshall (editors), *Biofilms*. (pp. 3-16). Toronto, Canada: John Wiley and Sons.

- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., & Hébraud, M. (2004). Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 236, 241-248.
- Chen, Y., Jackson, K.M., Chea, F.P., & Schaffner, D.W. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *J. Food Prot.*, 64, 72-80.
- Christensen B.B., Rosenquist, H., Sommer, H.M., Nielsen, N.L., Fagt, S., Andersen, N.L., & Nørrung, B. (2005). A Model of Hygiene Practices and Consumption Patterns in the Consumer Phase. *Risk Analysis.*, 25, 49-60
- Chung, K.T., Dickson, J.S., & Crouse, J.D. (1989). Attachment and proliferation of bacteria on meat. *J. Food Prot.*, 52, 173-177
- Davidson, C.A., Griffith, C.J., Peters, A.C. & Fielding, L.M. (1999). Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *J. Lumin.*, 14, 33-38.
- Dawson, P., Han, I., Cox, M., Black, C. & Simmons, L. (2006). Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella Typhimurium* from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. *J. Appl. Microbiol.* In press
- De Jesús, A.J., Olsen, A.R., Bryce, J.R., & Whiting, R.C. (2004). Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Int. J. Food Microbiol.*, 93, 259-262.
- den Aantrekker, E.D., Boom, R.M, Zwietering, M.H., & van Schothorst, M. (2003) Quantifying recontamination through factory environments-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 80, 117-130.
- Dickson, J.S. (1990). Transfer of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* Between Beef Tissue Surfaces. *J. Food Prot.*, 53, 51-55.
- Dickson, J.S., & Koohmaraie, M. (1989). Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 832-836.
- Dorsa, W.J., Cutter, C.N. & Siragusa, G.R. (1996). Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22, 39-41.
- Eisel, W.G., Linton, R.H., Muriana, P.M. (1997). Survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. *Food Microbiol.*, 14, 273-282
- Else, T.A., Pantle, C.R. & Amy, P.S. (2003). Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5006-5010.
- FDA/USDA/CDC. (2003). Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of Ready-to-Eat Foods. Available at <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>. Accessed 15 July, 2006.

Flint, S.H., Bremer, P.J., & Brooks, J.D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant—description, current concerns and methods of control. *Biofoul.*, 11, 81–97.

Flint, S.H., Brooks, J.D., & Bremer, P.J. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant *Streptococci*. *J. Food Eng.*, 43, 235–242.

Fliss, I., Simard, R.E. & Ettriki, E. (1991). Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. *J. Food Sci.*, 56, 249-250.

Foong, S.C.C. & Dickson, J.S. (2004). Attachment of *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Meats. *J. Food Prot.*, 67, 456-462.

Foschino, R., Picozzi, C., Civardi, A., Bandini, M., & Faroldi, P. (2003). Comparison of surface sampling methods and cleanability assessment of stainless steel surfaces subjected or not to shot peening. *J. Food Eng.*, 60, 375-381.

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/ U.S. Department of Agriculture) (2003). FSIS Risk Assessment for *Listeria monocytogenes* in Deli Meats. Available at <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/97-013F/ListeriaReport.pdf>. Accessed 14 October, 2006.

Gill, C.O., & Jones, T. (2002). Effects of Wearing Knitted or Rubber Gloves on the Transfer of *Escherichia coli* between Hands and Meat. *J. Food Prot.*, 65, 1045-1048.

Gillespie, I.A., O'Brien, S.J. & Goutam, K.A. (2001). General outbreaks of infections intestinal diseases linked with private residences in England and Wales 199-29: quationaire study. *British Med. J.*, 323, 1097-1098

Gorman, R, Bloomfield, S, & Adley, C.C. (2002). A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int. J. Food Microbiol.*, 76, 143-150.

Guðbjörnsdóttir, B., Einarsson, H. & Thorkelsson, G. (2005). Microbial Adhesion to Processing Lines for Fish Fillets and Cooked Shrimp: Influence of Stainless Steel Surface Finish and Presence of Gram-Negative Bacteria on the Attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol. Biotechl.*, 43, 55–61.

Haynes Jr, B.W. & Hench M.E. (1965). Hospital isolation system for preventing cross-contamination by staphylococcal and pseudomonas organisms in burn wounds. *Ann Surg.*, 162, 641–649.

Haysom, I. & Sharp, K. (2004) Cross contamination from raw chicken during meal preparation. *Brit. Food J.*, 106, 38-50

Haysom, I.W. & Sharp, A.K. (2005). Bacterial contamination of domestic kitchens over a 24-hour period. *British Food J.*, 107, 453-466.

Heal, J.S., Blom, A.W., Titcomb, D., Taylor, A., Bowker, K., & Hardy, J.R.W. (2003). Bacterial contamination of surgical gloves by water droplets spilt after scrubbing. *J. Hosp. Infect.*, 53, 136-139.

- Higgins, M.A. (1950). A comparison of the recovery rate of organisms from cotton-wool and calcium alginate wool swabs. *Monthly Bulletin Ministry of Health and PHLS.*, 9, 50-51.
- HPA (Health Protection Agency) (2005). Large outbreak of *Salmonella Hadar* in Spain associated with pre-cooked chicken. *Commun Dis Rep CDR Wkly*, 15, 7.
- Hudson, J.A., & S.J. Mott. (1993). Presence of *Listeria monocytogenes*, motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* in environmental samples taken from a supermarket delicatessen. *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 333-337.
- Hughes, K.H. (2003). Aerial dispersal and survival of sewage-derived faecal coliforms in Antarctica. *Atmos. Environ.*, 37, 3147-3155.
- Ivanek, R., Grönh, Y.T., Wiedmann, M. & Wells, M.T. (2004). Mathematical Model of *Listeria monocytogenes* Cross-Contamination in a Fish Processing Plant. *J. Food Prot.*, 67, 2288–2297.
- Joseph, S.K. Karunasagar, O.I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 367-372.
- Kishimoto, M., Hioki, Y., Okano, T., Konuma, H., Takamizawa, K., Kashio, H., & Kasuga, F. (2004). Ribotyping and a Study of Transmission of *Staphylococcus aureus* Collected from Food Preparation Facilities. *J. Food Prot.*, 67, 1116-1122.
- Knobben B.A.S., Van der Mei H.C., Van Horn J.R., & Busscher H.J. (2006). Transfer of bacteria between biomaterials surfaces in the operating room-An experimental study. *J. Biomed. Mat. Res. A.*, In press.
- Koutzayiotis, D., (1992). Bacterial biofilms in milk pipelines. *S. Afr. J. Dairy Sci.*, 64, 19-22.
- Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., & Beumer, R.R. (2002). Survival of food-borne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 85:227–236.
- Kusumaningrum, H.D., Van Asselt, E.D., Beumer, R.R., & Zwietering, M.H. (2004). A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. via domestic kitchen surfaces. *J. Food Prot.*, 67, 1892–1903.
- Leriche, V. Chassaing, D., & Carpentier, B. (1999). Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 169-182.
- Luber, P., Brynestad, S., Topsch, D., Scherer, K. & Bartelt, E. (2006). Quantification of *Campylobacter* species cross-contamination during handling of contaminated fresh chicken parts in kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 66-70.
- Lundén, J.M., Autio, T.J., & Korkeala, H.J. (2002). Transfer of Persistent *Listeria monocytogenes* Contamination between Food-Processing Plants Associated with a Dicing Machine. *J. Food Prot.*, 65, 1129-1133.

Lundén, J.M., Mettinen, M.K., Autio, T.J., & Korkeala, H.J. (2000). Persistent of *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact time. *J. Food Prot.*, 63, 1204–1207.

Mackintosh, C.A., & Hoffman, P.N. (1984). An Extended Model for Transfer of Microorganisms via the Hands: Differences Between Organisms and the Effect of Alcohol Disinfection. *J Hyg.*, 92, 345-355

Marples, R.R., & Towers, A.G. (1979). A laboratory model for the investigation of contact transfer of micro-organisms. *J. Hyg. Camb.*, 82, 237-248.

Martínez-Gonzales, N.E., Hernández-Herrera, A., Martínez-Chávez, L., Rodríguez-García, M., Torres-Vitela, M.R., Mota de la Garza, L., & Castillo, A. (2003). Spread of Bacterial Pathogens during Preparation of Freshly Squeezed Orange Juice. *J. Food Prot.*, 66, 1490-1494

Mattick, K., Durham, K., Domingue, G., Jørgensen, F., Sen, M., Schaffner, D. W., & 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.

Merry, A.F., Miller, T.E., Findon, G., Webster, C.S., & Neff, S.P.W. (2001). Touch contamination levels during anesthetic procedures and their relationship to hand hygiene procedures: a clinical audit. *Brit. J. Anaesth.*, 87, 291-294

Midelet, G. & Carpentier, B. (2002). Transfer of Microorganisms, Including *Listeria monocytogenes*, from Various Materials to Beef. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4015-4024.

Midelet, G., Kobilinsky, A. & Carpentier, B. (2006). Construction and Analysis of Fractional Multifactorial Designs To Study Attachment Strength and Transfer of *Listeria monocytogenes* from Pure or Mixed Biofilms after Contact with a Solid Model Food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2313-2321.

Montville, R., & Schaffner, D.W. (2003). Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 7188–7193.

Montville, R., Chen, Y.H., & Schaffner, D.W. (2001). Glove barriers to bacterial cross contamination between hands to food. *J. Food Prot.*, 64, 845-849

Moore, C.M., Sheldon, B.W., & Jaykus, L.A. (2003). Transfer of *Salmonella* and *Campylobacter* from stainless steel to Romaine lettuce. *J. Food Prot.*, 66, 2231–2236.

Moore, G. & Griffith, C. (2002). A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiol.*, 19, 65-73.

Müller, G. (1980). Airborne dissemination of bacteria from sewage treatment plants. *Environ. Int.*, 3, 283-291.

Oliver, S.P., Jayarao, B.M. & Almeida, R.A. (2005). Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2, 115 -129.

- Ollinger-Snyder, P. & Matthews, M. (1996). Food safety: Review and implications for dietitians and dietetic technicians. *J. Am. Diet. Assoc.*, 96, 163-168.
- Palumbo, S.A., Klein, P., Capra, J., Eblen, S., & Millar, A.J. (1999). Comparison of excision and swabbing sampling methods to determine the microbiological quality of swine carcass surfaces. *Food Microbiol.*, 16, 459-464
- Panisello, P.J., Rooney, R., Quantick, P.C., & Stanwell-Smith, R. (2000). Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *Int. J. Food Microbiol.*, 59, 221-234
- Patrick, D.R., Findon, G., & Miller, T.E. (1997). Residual moisture determines the level of touch-contact-associated bacterial transfer following hand washing. *Epidemiol Infect*, 119(3), 19-25.
- Pérez-Rodríguez, F., Todd, E.C.D., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M., & 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. *J. Food Prot.*, 69, 2384-2394
- Perez-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. Paper presented at the COST 920, Dubrovnik, Croatia.
- Pérez-Rodríguez, F., van Asselt, E.D, García-Gimeno, R.M., Zurera, G., & Zwietering, M.H. (2007). Extracting risk managers-information from a Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in deli meats. *J. Food Protect.* In press
- Redmond, E.C., Griffith, C.J., Slader, J, & Humphrey, T.J. (2004). Microbiological and observational analysis of cross contamination risks during domestic food preparation. *Brit. Food. J.*, 106, 581-597
- Reij, M.W., Aantrekker, W.D., & ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 91, 1-11.
- Roberts, D. (1990) Foodborne illness, sources of infection: food. *Lancet*, 336, 859-861
- Rosenquist, H., Nielsen, N.L, Sommer, H.M, Norrung, B., & Christensen, B.B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.*, 83, 87-103.
- Rusin, P., Maxwell, S., & Gerba, C. (2002). Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and phage. *J. Appl. Bacteriol.*, 93, 585-592.
- Salo, S., Laine, A., Alanko, T., Sjöberg, A.M., & Wirtanen, G. (2000). Validation at the microbiological methods Hygicult dipslide, contac plate, and swabbing in surface hygiene control: a Nordic collaborative study. *J. AOAC Int.*, 83, 1357-1365

- Sattar, S.A., Springthorpe, S., Mani, S., Gallant, M., Nair, R.C., Scott, E., & Kain, J. (2001). Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 962-970
- Schaffer, D.W. (2004). Mathematical Frameworks for Modeling *Listeria* Cross-contamination in Food-processing Plants. *J. Food Sci.*, 69, 155-159.
- Scheusner, D.L. (1982). Methods to evaluate cleaner and sanitizers. *J. Food Prot.*, 45, 1257-1260.
- Scott, E., & Bloomfield, S.F. (1990). The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *J Appl Bacteriol.*, 68(3), 271-278.
- Sommer, P., Martin-Rouas, C., & Mettler, E. (1999). Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiol.*, 16, 503-515
- Tebbutt, G.M. (1991). An assessment of cleaning and sampling methods for food-contact surfaces in premises preparing and selling high-risk foods. *Epidemiol. Infect.*, 106, 319-327
- Vermeltfoort, P.B., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Hooymans, J.M., & Bruinsma, G.M. (2004). Physicochemical factors influencing bacterial transfer from contact lenses to surfaces with different roughness and wettability. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 7, 336-42.
- Veulemans, A., Jacqmain, E. & Jacqmain, D. (1970). Etude d'une méthode simple pour la détermination du degré de pollution des surfaces et la comparaison du pouvoir de divers produits d'entretien. *Rev. Ferment. Ind. Aliment.*, 25, 58-65
- Vorst, K.L., Todd, E.C., & Ryser, E.T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *J. Food Prot.*, 69, 619-626.
- Vorst, K.L., Todd, E.C., Perez-Rodríguez, F., McMasters, R.L., & Ryser, E.T. (2004). Transfer of *Listeria monocytogenes* from a delicatessen slicer to ready-to-eat meat products. Paper presented at the IAFP's 91st Annual Meeting, Phoenix, AZ.
- Wachtel, M.R., Mcevoy, J.L., Luo, Y., William Campbell, A.M. & Solomon, M.B. (2003). Cross-contamination of lettuce by *Escherichia Coli* O157:H7 via contaminated ground beef. *J. Food Prot.*, 66, 1176-1183.
- Weber, D.J. & Rutala, W.A. (1997). Role of Environmental Contamination in the Transmission of Vancomycin-resistant Enterococci. *Infect. Con. Hosp Ep.*, 18(5), 306-309.
- WHO (World Health Organization) (2003). 8th report 1999-2000 of WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Available at http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm. Accessed 14 October, 2006.

- Wilks, S.A., Michels, H.T. & Keevil, W. (2006). Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: Implications for cross-contamination. *Int. J. Food Microbiol.*, 111, 93–98
- Wilks, S.A., Michels, H.T., & Keevil, C.W. (2005). The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 445–454.
- Yamaguchi, N., Ishidoshiro, A., Yoshida, Y., Saika, T., Senda, S., & Nasu, M. (2003). Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Meth.*, 53, 405-410.
- Yan, Z., Todd, E., & Ryser, E. (2005). Optimization of recovery methods for *Listeria monocytogenes* from conveyor belt surfaces. Abst. Ann. Mtg. Int. Assoc. Food Prot., Baltimore, MD.
- Yang, H., Mokhtari, A., Jaykus, L., Morales, R.A., Cates, S.C., & Cowen, P. (2006). Consumer Phase Risk Assessment for *Listeria monocytogenes* in Deli Meats. *Risk Anal.*, 26, 89-103.
- Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M.P, Rubino, J.R., & Meng, J. (1998). Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *J. Food Prot.*, 61, 960–963.

2. Desarrollo de modelos de contaminación cruzada: Estudio de la transferencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 durante el loncheado de productos cárnicos cocidos.

Como se ha puesto de manifiesto en el capítulo anterior (“Revisión de los fenómenos de contaminación cruzada en alimentos: Factores de riesgo y Modelos matemáticos”), existe una carencia notable de modelos de contaminación cruzada para su aplicación en la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano en alimentos (ECRM).

La contaminación cruzada se considera uno de los factores más importantes en la aparición de brotes alimentarios en la etapa de consumo doméstico. Sin embargo, la información publicada sobre transferencia bacteriana entre superficies es limitada. El objetivo de este estudio fue cuantificar la tasa de transferencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 entre una máquina loncheadora de uso doméstico y un producto cárnico cocido (“chopped pork”) durante el proceso de loncheado y proponer modelos matemáticos para sendos microorganismos que puedan ser aplicados en una ECRM.

Los resultados mostraron que ambos microorganismos pudieron transferirse a todas las lonchas analizadas (20 lonchas sucesivamente loncheadas), y además, a diferentes niveles de inóculo inicial sobre la hoja de corte (10^8 , 10^6 , 10^4 ufc/hoja). No obstante, las tasas de transferencia obtenidas fueron bajas comparadas con otros estudios de transferencia. También, el análisis de los datos de transferencia (expresados como \log ufc/cm²) reveló que la concentración microbiana presente en las lonchas decreció durante el loncheado siguiendo un proceso logarítmico, lo cual pudo ser observado para ambos microorganismos y a niveles de inóculo de 8 y 6 \log ufc/hoja. Sin embargo, en el caso de 4 \log ufc/hoja, *S. aureus* no mostró una tendencia definida, mientras que para *E. coli* O157:H7 no se obtuvieron valores de concentración, aunque se detectó presencia en todas las lonchas analizadas después de su enriquecimiento en medios selectivos adecuados.

Por otra parte, el análisis de varianza indicó que el tipo de microorganismo no influyó significativamente sobre la tasa de transferencia ($p < 0,05$). Además, este mismo análisis puso de manifiesto una interacción entre el nivel de inóculo y la tasa de transferencia para *S. aureus* ($p < 0,05$), aunque no fue así para *E. coli* O157:H7. Finalmente, se ajustaron dos modelos matemáticos (modelo logarítmico-lineal y modelo Weibull) a los datos de transferencia de ambos microorganismos (para los tamaños de inóculo de 6 y 8 \log ufc/hoja), con el propósito de su posterior utilización en una ECRM. Ambos modelos presentaron un buen ajuste a los datos ($R^2 \leq 0,73$), siendo el modelo Weibull el que mejor se ajustó a las primeras lonchas, que fueron las que presentaron los niveles más altos de microorganismos patógenos, y por tanto, de riesgo. En resumen, el presente trabajo propone el modelo de Weibull como el más adecuado, concretamente, para el caso de *S. aureus*, el cual necesita de

relativamente altos niveles de concentración ($\geq 10^5$ ufc) para producir enterotoxina.

El presente capítulo ha originado la siguiente publicación:

Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product

¹Pérez-Rodríguez*, F., ¹Valero, A., ²Todd, E.C.D., ¹Carrasco, E., ¹García, RM^a., and ¹Zurera, G.

¹Department of Food Science and Technology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, C-1, 14014 Córdoba, Spain

²National Food Safety & Toxicology Center, 165 Food Safety & Toxicology Building, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1314, U.S.A.

Meat Science, aceptado para publicación

Modeling transfer of *Escherichia coli* O57:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product

2.1. Abstract

Cross contamination is one of the most important contributing factors in foodborne illnesses originating in household environments. The objective of this research was to determine the transfer coefficients between a contaminated domestic slicing machine and a cooked meat product, during slicing. The microorganisms tested were *Staphylococcus aureus* (Gram +) and *Escherichia coli* O157:H7 (Gram -). The results showed that both microorganisms were able to transfer to all slices examined (20 successively sliced) and at different inoculum levels on the blade (108, 106, 104 cfu/blade). The results also showed that the number of log cfu transferred per slice, during slicing, decreased logarithmically for both microorganisms at inoculum levels of 8 and 6 log cfu/blade. The type of microorganism significantly influenced transfer coefficients ($p < 0.05$) and there was an interaction between inoculum level and transfer coefficient for *S. aureus* ($p < 0.05$), but not *E. coli* O157:H7. Finally, to describe bacterial transfer during slicing, two models (log-linear and Weibull) were fitted to concentration on slice data for both microorganisms (at 6 and 8 log cfu/blade), obtaining a good fit to data ($R^2 \geq 0.73$).

2.2 Introduction

In Spain, from 1993 to 1998, 49% of foodborne outbreaks occurred in the household environment, being *Salmonella* the main responsible pathogen (~60 %) followed by *Staphylococcus spp.* (BgVV-FAO/WHO, 2000; Hernandez, Mangas, de Mateo, Liacer, Eiman, and Sanchez-Serrano, 1998). These data showed that consumers often failed to store, handle and prepare food in a hygienic and safe manner. Moreover, studies such as those of Gorman, Bloomfield, and Adley (2002); Mattick et al. (2003) and Bloomfield (2003) have demonstrated the ability of pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* to be transferred from contaminated food to hand and food contact surfaces in the domestic kitchen. Thus, Beumer and Kusumaningrum (2003) and Bloomfield and Scott (1997) stated that cross contamination in the kitchen environment can be a significant factor in the household outbreaks.

Reij, Aantrekker and ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. (2004) reviewed scientific literature on recontamination routes and sources (e.g. raw materials, food contact surfaces, food handlers, etc.) and demonstrated their relevance in contributing to foodborne disease outbreaks. They also suggested that such knowledge on recontamination should be incorporated into exposure assessments of quantitative microbiological risk assessments (QMRA) to help in determining mitigation strategies to reduce foodborne disease. Thus, the importance of performing QMRA (Codex Alimentarius Commission, 1999) has led to researchers to try and quantify cross contamination events. For instance, Zhao, Zhao, Doyle,

Rubino, and Meng (1998); Chen, Jackson, Chea, and Schaffner (2001); Montville, Chen, and Schaffner (2001) determined the transfer coefficient of *Enterobacter aerogenes* as a surrogate microorganism for *Salmonella* through different handling scenarios. The transfer coefficient is the proportion of cells that is transferred between surfaces (food, equipments, tools, hands, etc.) under one or more operations. The study provided probability distributions of transfer coefficients associated with different handling tasks, and also demonstrated that the microorganism could be transferred from hands to food even with the use of gloves. In addition, Kusumaningrum, Riboldi, Hazeleger and Beumer (2002) noted that the transfer ability of *S. aureus*, *Campylobacter jejuni* and *Salmonella Enteritidis* between cutting board and foods at different pressure levels was not dependent on the type of organism.

Recent outbreaks caused by *E. coli* O157:H7 associated with cross contamination between raw meat and raw vegetables, prompted Wachtel, McEvoy, Lyo, William-Campbell and Solomon (2003) to quantify the transfer of *E. coli* O157:H7 from raw contaminated meat to hands and cutting surfaces, and then to iceberg lettuce by contaminated hands and cutting boards. They studied the effect of successive contacts (cutting lettuce leaves with a contaminated knife) on whether or not and how much was transferred. The result revealed the random nature of cross contamination events when they used low inoculum. This fact was also pointed out by Vorst, Todd and Ryser (2006) when slicing deli meats with a blade inoculated with 10^3 cfu of *Listeria monocytogenes*. Also, in previous studies, we simulated experimentally the transfer of *S. aureus* and *L. monocytogenes* to a cooked meat product through a slicing machine; the results indicated that bacteria were transferred logarithmically to slices during slicing (Pérez-Rodríguez, Fuentes, Valero, Carrasco, García-Gimeno, and Zurera, 2004; Vorst, Todd, Pérez-Rodríguez, McMasters, and Ryser, 2004).

In the present work, we determined the transfer coefficients at different inoculum levels of two pathogens, one Gram positive (*S. aureus*) and the other Gram negative (*E. coli* O157:H7), between a contaminated slicing machine and a cooked meat product. Finally, two mathematical models were fitted to transfer data to enable its inclusion in QMRA.

2.3. Material and Methods

2.3.1. Inoculum preparation

Five strains of *S. aureus* (CCM 1484, ATCC 13565, CCTM La 2812, ATCC 19095, ATCC 23235) and four of *E. coli* O157:H7 (CCUG 20570, ATCC 35150, ATCC 43894, ATCC 43895) were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT). All strains were maintained at -18°C in cryovial containing beads and cryopreservative (Microbank™). Three days before the experiment, a bead of each strain was transferred to a tube containing 10 ml of Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid, UK) and incubated at 37°C for 24 h. Then, 1ml of the initial subculture was pipetted on a tube containing 10 ml of TSB, and incubated at 37°C for 24 h. Finally, a third subculture was obtained in the same way, incubating 1ml of inoculum in a flask of 100 ml of TSB until the early stationary phase was reached (16 and 18 h for *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*, respectively). Cocktails of strains for each pathogen were generated by

mixing 10-ml aliquots containing similar numbers of each strain, diluted in TSB to approximately 10^4 , 10^6 , and 10^8 cfu/ml.

2.3.2. Slicing Machine and Artificial contamination

Before use, a domestic slicer and a polished stainless steel blade (Demoka ®, M-381 Zeta Plus Ø) were disinfected with 70% (v/v) ethanol for 10 min. Then, both were washed with hot water with anionic-active detergent and rinsed with distilled water. The slicing machine surfaces and the blade were sprayed with 70 % (v/v) ethanol and allowed to evaporate prior to any contamination step. The blade was inoculated at the different concentrations (10^4 , 10^6 and 10^8 cfu) with a pipet containing 0.5 ml of TSB of the appropriate cocktail. The TSB medium was used in the inoculum to simulate soiled conditions in the blade (Moore, Sheldon and Jaykus, 2003). The inoculum was allowed to dry in a laminar flow cabinet for 50 min at 25° C and 50 % Relative Humidity.

2.3.3. Transfer of *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 from contaminated blade at different inoculum levels via the slicer to uninoculated cooked meat product by slicing

Large pieces of pork were used to simulate a delicatessen meat product that could be contaminated with the inoculated blade. Each piece of pork was trimmed uniform so that all slices had a similar area and weight, and have plain and uniform surface for slicing. After drying, the inoculated blade was placed in the slicer, and then a pork piece was sliced up to 21 slices (7-10 g each). Each slice was picked up as it came off the machine by using a pair of sterilized pincers and placed in sterile stomacher bags. Three repetitions for each inoculum level were performed. The pressure applied on the pork piece was assumed to be similar to that occurring at household slicing.

2.3.4. Estimation of the force or pressure applied during slicing

A sensor film provided by Sensor Products Inc was utilized to estimate the force level applied during slicing. The type of sensor film was Ultra Low Pressurex ®, specially intended for a pressure range of ~ 2 -6 kg/cm². The sensor film was placed between the pork piece and the guard area of the slicer. Next, the pork piece was pushed against the blade simulating a normal slicing process in a retail delicatessen. Then, the sensor film was removed and prepared according to manufacture's instructions to be sent for exhaustive image analysis; this analysis revealed the pressure distribution applied on the pork surface.

2.3.5. Microbiological Analysis

Efficacy of the disinfection process

To prove the effectiveness of the disinfection process, Plate Count Agar (PCA, Oxoid, UK), MacConkey (MCA, Oxoid, UK) and Baird Parker agar/medium (BP, Oxoid, UK) with tellurite egg yolk supplement (Oxoid, UK) Rodac plates were pressed

on three different zones in the slicing machine, including the blade, and incubated at 30°C for PCA and 37°C for MCA and BP.

Chopped pork piece control

Before each experiment, two samples (10 g) of pork were placed into sterile stomacher bags with peptone buffer 1 % and homogenized in a Stomacher (Seward Stomacher 400 Colworth House, England) for 2 min and tested for the presence of *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 by using the enrichment methods described below.

Quantification of transfer

To estimate the number of viable cells transferred during the slicing process (up to 21 slices), slices were placed independently into sterile stomacher bags and filled with 90 ml of peptone buffer 1 % and then homogenized in the Stomacher for 2 min. Serial decimal dilutions were prepared in saline solutions, cultured on agar plates and the colonies were enumerated. The selective medium and conditions for *S. aureus* were BP with tellurite egg yolk supplement incubated at 37°C for 48 h; for *E. coli* O157:H7, MCA incubated at 37°C for 24 h was used. As required, the samples not detectable by direct plating were enriched by incubating the flasks containing homogenized samples at 37°C for 24 h. In the case of the *S. aureus* assay, the flasks were supplemented with NaCl and Sodium Pyruvate to reach a concentration of 20% and 1%, respectively. In the case of *E. coli*, the flasks were supplemented with Cifixime and vancomycin (Dodd et al., 2003). Then, the enriched samples were examined for presence/absence by spreading 10 µl of enriched samples on BP tellurite egg yolk in the case of *S. aureus* and Sorbitol MacConkey with Potassium tellurite and cefixime for *E. coli* O157:H7 (SMAC, Oxoid, UK) (37°C for 24 h). Any growth on the SMAC plates which had shown characteristic colonies of *E. coli* O157:H7 was considered to have been transferred from the blade to the slices.

2.3.6. Data and statistical analysis

The detection limit of the microbiological analysis varied depending on the slice weight, but was, on average around 30 cfu/ slice for both pathogens. For data analysis, we used this limit on those slices in which counting was not possible, but were positive in the enrichment analysis.

The concentration of pathogen on slice were expressed per cm² of slice and logarithmically transformed (log cfu/cm²) in Excel (Microsoft Corporation) spreadsheet. Two different mathematical models were fitted to the data to describe the concentration variation on slice as a function of the number of slice taken ($N_{\text{slice}}=1, 2, \dots, 20$).

In this study, transfer coefficient is the logarithm of the proportion (%) of bacterial cells transferred from the blade to each slice (expressed per cm²) (1). The transfer coefficients were tested by analysis of variance (ANOVA), and Duncan's multiple-range tests using SPSS 12.0 software (SPSS inc. N.C.) for the factors type of microorganism and inoculum level on blade.

$$Tr(\%) = \log \left[\frac{cfu / cm_{slice}^2}{cfu_{blade}} \times 100 \right] \quad (1)$$

2.3.7. Mathematical models

A log-linear model ($\log(B) = \log(A) - k \cdot N$) has been used in previous studies to describe attachment strength of bacteria in surface (ease of removal) (Veulemans et al. 1970; Midelet and Carpentier, 2002). The model accounts for a first-order kinetic. Such a model was fitted to experimental data consisting of the number of colonies transferred to successive plates by contact or swabbing (Richard and Piton, 1986; Erginton, Holah, Allison, Handley and Gilbert., 1995; Erginton, 1998). The steeper the slope, the weaker the microorganisms' attachment strength. Based on this approach, we propose to use the log-linear model (semi-logarithmic model) described by equation (2) to determine the bacterial concentration on the successive slices:

$$\log(I_{slice}) = \log(I_{blade}) - k \cdot N_{slice} / \ln(10) \quad (2)$$

where N_{slice} is the number of slice ($N_{slice}=1, 2, \dots, 20$); I_{slice} is the concentration (log cfu/cm²) on the slice N_{slice} ; I_{blade} is a regression parameter (the intercept); $k/\ln(10)$ is a regression parameter related to the slope through the calculation.

We decided to also use a non-linear model to model the transfer data. We chose the Weibull model because the underlying principles of this model, which allows modeling of the processes occurring during bacterial transfer between surfaces. Weibull distributions are usually applied to objects with a large number of links, each of which has a certain probability of breaking. In many cases, when only one link breaks, the object can experience failure (Olkin, Gleser, and Derman, 1980). For this reason, Weibull distributions are widely used to model lifetime or failure time events (e.g. bulbs lifetime, fatigue of materials, etc.). Furthermore, Weibull distributions are often used to model the time interval between successive, random, independent events that occur at a variable rate (Vose, 2000; Cullen and Frey, 1999). In predictive microbiology, Weibull models have been applied to represent the logarithmic process of bacterial inactivation (Peleg and Cole, 1998; Fernández, Collado, Cunha, Ocio, Martinez, 2002). In cross contamination events, the initial bacterial population on a surface includes a complex net of interactions between the bacteria and the contact substrate through attachment, in which each component has a certain probability of breaking. To enable bacterial transfer between surfaces it is necessary that these interactions fail (attachment structures), and bacteria can travel from one surface to another (Dickson, 1990). Therefore, based on this hypothesis, contamination or recontamination between surfaces by contact could be described by means of a probability curve of breaking probabilities, i.e. the Weibull distributions. The other advantage of using Weibull distributions, compared to others such as exponential or gamma distributions, is its high flexibility to fit to many types of data (Vose, 2000). The Weibull model used to fit the data is shown in Equation (3), which has two parameters,

a and b . The parameter a is considered as a reaction rate constant and b as a behaviour index. This model reduces to a linear model when $b=1$.

$$\log(I_{slice}) = \log(I_{blade}) - (N_{slice} / a)^b \quad (3)$$

2.4. Results and discussion

The analysis of the control samples performed on the pork pieces confirmed the absence of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*. The first slice of every assay was discarded since the contaminated side of the blade did not come into contact with this slice, and it was therefore not contaminated.

The image analysis obtained by Ultra Low Pressurex® showed that pressure was variable along the slice surface (see Figure 1). The highest pressure value was around 6.75 kg/cm², but more typical values showed pressure on slices around 2.50 kg/cm².

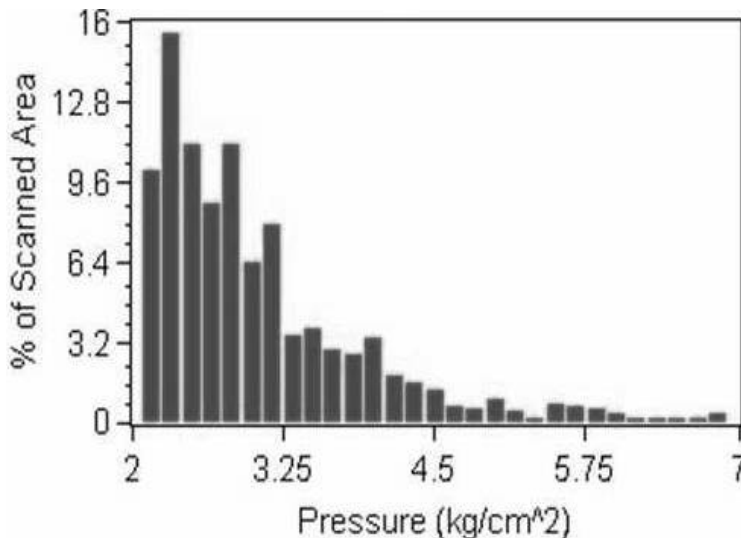


Figure 1. Distribution of pressures along the slice area observed during simulation of slicing obtained by using Ultra Low Pressurex®.

2.4.1. Low transfer ability

The summary of the experimental data are shown in Table 1. The transfer values expressed as $\log Tr(\%)$ ranged between 1.11 and $-4.34 \log$, values corresponding to *S. aureus* at 8 log cfu/blade and *E. coli* O157:H7 at 6 log cfu/blade, respectively. The magnitude of transfer data was much lower than the levels found by Kusumaningrum et al. (2002), who showed that 25 % to 100 % (expressed arithmetically and per cm²) of *S. aureus*, *Campylobacter jejuni* and *Salmonella Enteritidis* on stainless steel boards were transferred to roast chicken and cucumber. Similarly, Scott and Bloomfield (1990) reported transfer coefficients of approximately 20 and 21% for *E. coli* and *S. aureus*, respectively, from contaminated laminate surfaces to stainless

steel bowl with low initial inoculum levels. This is consistent with the findings of Moore, Sheldon and Jaykus (2003) who demonstrated that the mean transfer coefficients from contaminated stainless steel to lettuce ranged from 2.3 to 66 % for *Salmonella* and from 16.3 to 38.4 % for *Campylobacter*. In contrast, lower transfer coefficients generally occur with non-uniform or porous surfaces such as, faucets, sponges, hands, etc. An example is the transfer of only 0.47% *E. coli* from a damp cloth (inoculated with 10^7 cfu/cm²) to the human hand (Mackintosh and Hoffman, 1984). Similar transfer levels were reported by Chen et al. (2001) for *E. aerogenes*'s transfer between chicken, hands and spigots and by Wachtel et al. (2003) for *E. coli* O157:H7 through fingers. Rusin, Maxwell and Gerba (2002) reported transfer coefficients between 28-65 % for non-porous surfaces such as faucets or phone receivers with a high initial inoculum level of 10^8 cfu/fomite, but < 0.01 % when porous surfaces were used, e.g. sponge, dishcloth, laundry. This is understandable since most of the inoculum is no longer in contact with the surface of transfer material. Even though our data indicated low transfer rates, this can be explained because a slicing machine is different from the static contact experiments in the other studies. Transfer during slicing involves horizontal movement between surfaces when cooked meat surface runs over the blade, and at the same time the latter revolves rapidly. Thus, food particles with the inoculum would tend to be spun off during the slicing process onto other parts of the slicing machine and also into the larger environment. This is what Vorst et al, (2006) found for *Listeria monocytogenes* in deli meats on a similar slicing machine.

2.4.2. Logarithmic decrease during slicing

The transfer results for *S. aureus* are expressed as log cfu/cm² (per slice) in Figure 2. At inoculum levels of 8 and 6 log cfu/ blade, cells transferred during slicing (log cfu/slice) decreased logarithmically from the first documented slice to the last slice in 1.68 and 1.74 logarithms, respectively. In the case of 4 log cfu/blade, the results showed a high degree of variability as shown in Figure 2, where bars representing the standard deviation were longer. Moreover, transferred cells did not seem to follow a clear trend, probably, due to the low precision of microbiological method at low concentrations. Likewise, cells transferred during slicing decreased logarithmically from the first documented slice to the last slice in 0.80 log cfu/cm² which might be considered within the experimental error range (Mossel, Corry, Struijk and Baird, 1995).

The results for *E. coli* O157:H7 in Figure 3 showed that for 8 and 6 log cfu/ blade, the cells transferred during slicing decreased logarithmically from the first documented slice to the last slice in 1.44 and 2.03 log cfu/cm², respectively, showing a linear-logarithmic trend as in the case of *S. aureus*. For the lowest inoculum of 4 log cfu/blade, no counts were obtained in any of the slices in the three repetitions. However, the analysis by enrichment demonstrated that the 20 slices were contaminated by *E. coli* O157:H7.

Table 1. Summary of the transfer data for *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 from an inoculated slicing machine blade to pork pieces at inoculum levels of 8, 6 and 4 log cfu/blade

Inoculum (log cfu/blade)	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i> O157:H7		
	log cfu/cm ²	Tr(%) ¹	Tr _r (%) ²	log cfu/cm ²	Tr(%)	Tr _r (%)
8	5.34 ± 0.58	-1.25 ± 0.58 ^a	1.76 ± 0.07 ^a	3.43 ± 0.83	-2.77 ± 0.90 ^a	0.62 ± 0.67 ^a
6	2.78 ± 0.73	-1.62 ± 0.79 ^{ab}	1.37 ± 0.27 ^a	1.41 ± 0.90	-2.67 ± 0.95 ^a	0.60 ± 0.90 ^a
4	0.99 ± 0.73	1.48 ± 0.77 ^b	1.65 ± 0.32 ^a	-	-	-

± indicates the standard deviation.

^a and ^b indices show the different homogenous groups reported by Duncan’s test.

¹Tr(%)= log[(cfu_{slice} per cm² / cfu initial on blade)*100].

²Tr_r(%)= log[(cfu transferred in 20 slices/ cfu initial on blade)*100].

The highest quantity of cells transferred per slice did not always correspond to the first slice. For example, at 6 log cfu/ blade, although the first slice had 3.71 ± 0.27 log cfu/cm², the highest concentration was marginally higher for the second and third slices, 3.87 ± 0.26 and 3.80 ± 0.41 log cfu/cm², respectively. This same observation can be observed for *E. coli* O157:H7 at 8 log cfu/blade, in which the first and second slice had 3.97 ± 1.10 and 4.66 ± 0.72 log cfu/cm², respectively. These facts can be evidenced visually in the graphs of Figure 2 and 3.

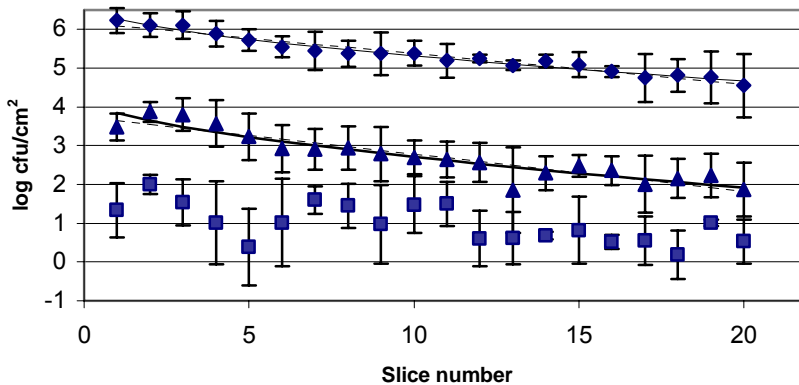


Figure 2. Transfer (log cfu/cm²) of *S. aureus* from an inoculated slicer blade with 8 (◆), 6 (▲) and 4 (■) log cfu/blade. Data reported are means ± standard deviation for three replicates. The Log-linear (----) model and Weibull (—) models fitted to transfer data at 8 and 6 log cfu/blade

2.4.3. Influence of microorganism type and inoculum size on transfer coefficients

The analysis of variance of the transfer data ($Tr(\%)$) at 8 and 6 log cfu/blade, according to Equation 1, showed significant differences between both microorganisms ($p = 0.014$). Also, the analysis of variance of the $Tr_T(\%)$ in 20 slices ($\log [\text{cfu transferred in 20 slices}/\text{cfu initially on blade}] \times 100$) at 8 and 6 log cfu/blade revealed significant differences for the type of microorganism ($p=0.003$). A possible explanation for this fact is the different susceptibility of both microorganisms to stressful environmental conditions, which is higher for *E. coli* O157:H7. Kusumaningrum et al. (2002) reported no significant differences in transfer coefficients among their inoculated strains (*S. aureus*, *C. jejuni* and *S. Enteritidis*) when roasted chicken and cucumber were contaminated under pressure. However, without any pressure, the analysis of variance did indicate significant differences for the three organisms. In this scenario, in addition to the absence of pressure, the shorter drying time prior to the contact (≤ 15 min), and relatively high resistance under stressful conditions of the test microorganisms (the most susceptible microorganism to slow-air-drying, *C. jejuni*, was detectable on contaminated surface until 4 h) could explain the divergence in results between the studies. Moreover, Erginton, et al. (1995) did not find significant difference in the degree of attachment to surfaces between the microorganisms, which may affect their transfer ability

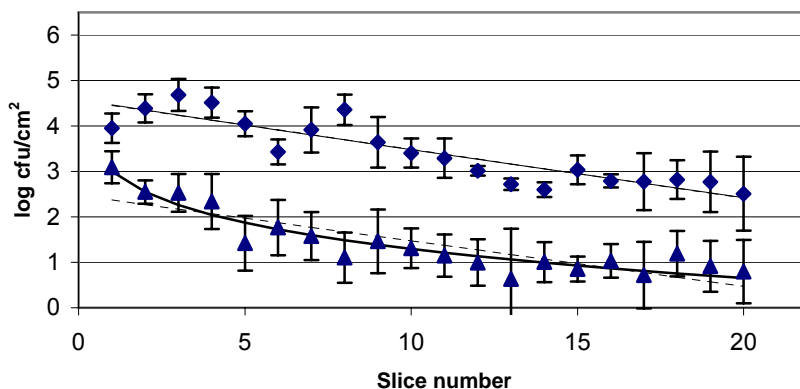


Figure 3. Transfer ($\log \text{cfu}/\text{cm}^2$) of *E. coli* O157:H7 from an inoculated slicer blade at 8 (◆) and 6 (▲) log cfu/ blade. Data reported are means \pm standard deviation for three replicates. The Log-linear (----) model and Weibull (—) models are fitted to transfer data at 8 and 6 log cfu/blade.

In respect to the inoculum level effect, the analysis of variance and Duncan's test performed on the first six slices (with the highest transfer coefficients) showed significant differences for *S. aureus* ($p= 0.027$) but not for *E. coli* O157:H7 ($p= 0.894$). The analysis of variance including 20 slices gave the same result. Thus, for *S. aureus*, there was significant difference ($p= 0.034$) and Duncan's test indicated the existence of two homogeneous groups, the first one formed by the transfer data of 4 and 6 log cfu/blade and the second one formed by 6 and 8 log cfu/blade) (Table 1).

Other variance analysis performed by comparing the $Tr_t(\%)$ for *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 indicated no significant difference between inoculum levels for both pathogens ($p=0.327$ and 0.982 , respectively) (Table 2). Therefore, it can be concluded, for *S. aureus*, the 8 and 6 log cfu/blade inoculum level group exerted a statistically different effect on $Tr(\%)$ from the 6 and 4 log cfu/blade group. However, in the case of *E. coli* O157:H7 it was clear that the inoculum size did not influence the transfer capability of the microorganism. These conclusions did not agree with those reported by Montville and Schaffner (2003) who stated that “When the population of bacteria on the source surface was high, the log 10 percent transfer was relatively low. Where the population on the source surface was lower, the log 10 percent transfer tended to be higher”. Our results are more consistent with the findings of Kusumaningrum et al. (2002) who did not find significant differences between different inoculum levels for *S. aureus*, *C. jejuni* and *Salmonella* Enteritidis, and of Dickson (1990), who worked with *L. monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*.

2.4.4. An example of modeling transfer data for the QMRA

Transfer data obtained for the levels 6 and 8 log cfu/blade were used to fit two mathematical models described previously, which could be applied in QRMA to describe cross contamination scenarios. We only used the data at high inoculum levels for *S. aureus* and *E. coli* (log 6 and 8 cfu/blade), because the transfer trends at 4 log cfu/blade were not obvious and much of the transfer data were generated through enrichment only. To perform the model, we preferred to use, as transfer unit, the concentration transferred on slice (log cfu/cm²) since this could be easily interpreted and used by modelers in QRMA. Nevertheless, the models represented by equation (2) and (3) could be log-back-transformed easily resulting in equation (4) and (5) for the log-linear and the Weibull model, respectively:

Equation (4) and (5) return the transfer coefficients measured as a fraction of 1, but it could also be expressed as % cfu/cm² if it is multiplied by 100.

$$I_{slice} / I_{blade} = \exp(-k \cdot N_{slice}) \quad (4)$$

$$I_{slice} / I_{blade} = 10^{-[(N_{slice} / a)^b]} \quad (5)$$

Parameters and goodness-of-fit indices for the log-linear and Weibull model are shown in Table 2, and the fitting lines are plotted in Figure 2 and 3. With regards to the log-linear model, *S. aureus* and *E. coli* presented a logarithmic trend at 8 and 6 log cfu/ blade ($R^2= 0.73-0.95$), though *S. aureus* showed the best fit as shown by the values of SEP (Standard Error of Prediction) and R^2 (see Table 2). These findings agreed with the results of Vorst et al.(2006) who reported that with 8 log on blade, the proportion of *L. monocytogenes* cells transferred to ready-to-eat turkey and bologna decreased logarithmically during slicing ($R^2>0.92$). At 8 and 6 log cfu/blade, the model showed higher slopes for *E. coli* O157:H7 ($k/\ln(10) =0.11$ and 0.10 , respectively) than for *S. aureus* ($k/\ln(10)= 0.08$ and 0.09 , respectively). Therefore,

when using log-linear model to describe the transfer, these results would indicate that the logarithmic decrease was slightly more rapid for *E. coli* O157:H7 at 8 log cfu/blade, while at 6 log cfu/blade, the slopes for both microorganisms were practically similar.

Table 2. Regression parameters and goodness-of-fit indices for both semi-logarithmic and Weibull models obtained from transfer data of *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 at 8 and 6 log cfu/blade.

	log cfu/blade	Log linear model				Weibull model				
		k^a	$\log(I_{blade})$	R^2	SEP ^b	a^c	b^c	$\log(I_{blade})$	R^2	SEP
<i>S. aureus</i>	8	0.18	6.17	0.95	2.04	6.50	0.59	6.60	0.97	1.66
	6	0.22	3.74	0.86	8.66	5.15	0.61	4.21	0.88	8.30
<i>E. coli</i> O157:H7	8	0.25	4.56	0.80	9.43	9.08	0.97	4.58	0.80	9.70
	6	0.23	2.47	0.73	25.96	$7 \cdot 10^{-5}$	0.15	7.15	0.89	17.20

^a k is the slope of the semi-logarithmic model: $\log(I_{slice}) = \log(I_{blade}) - k \cdot N_{slice} / \ln(10)$

$$^b\text{SEP (Standard Error of Prediction): } SEP = \frac{100}{\bar{y}_{obs}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{obs} - y_{pred})^2}{n}}$$

^c a and b are parameters of the Weibull model: $\log(I_{slice}) = \log(I_{blade}) - (N_{slice} / a)^b$

Parameters and goodness-of-fit indices for the Weibull model are shown in Table 2 and the fitting lines are plotted in Figure 2 and 3. In comparison, the Weibull model presented a better fit than the log-linear for both microorganisms (see Table 2). In the case of *E. coli* at 8 log cfu/ blade, the Weibull model almost described a log linear model since the value for the parameter b was practically 1. Hence, both curves overlap as can be seen in Figure 3. Though the goodness-of-fit indices showed little difference between the models, we believe that the Weibull model overall best models the experimental data, specially where the first slices showed much higher concentration than the rest (two phases in the curve), e.g. at 6 log cfu/ blade for *E. coli* O157:H7 (Figure 3). These values are crucial in risk, so a better fit in this zone would lead to more accurate risk estimation in QMRA. In this respect, the application of the Weibull model would be more relevant for *S. aureus* due to the fact that production of enterotoxin is mainly associated to relatively high concentrations of pathogen, i.e. $> 10^5$ cfu/g (Anunciacao, Linardi, do Carmo, and Bergdoll, 1995; Rörvik and Granum, 1996). However, for *E. coli* O157:H7, it is well-recognized that the infectious dose is estimated to be well under 100 organisms (Tilden et al., 1996).

2.5. Conclusions

Firstly, the results show that all the pork slices could be contaminated by both pathogens at the inocula of log 4, 6 and 8 log cfu slicing machine blades, even though the transfer was lower than in other transfer scenarios. As expected, the first

slices had the highest contamination levels, and the risk of illness would be higher after eating these compared to the subsequent slices in a product being sliced. This fact is even more relevant in those pathogens that should be ingested at high dose to produce illness, such as *L. monocytogenes* or *S. aureus* (but not *E. coli* O157:H7). However, the risk of the latter slices causing illness would be increased if growth of the pathogens were allowed during storage. This would be less likely for *S. aureus* unless the slices were kept at ambient temperatures for several hours sufficient to produce enterotoxin; nevertheless this has happened with other foods in causing mass casualties (Do Carmo et al., 2004). Therefore, the stage in slicing where the cross contamination takes place (i.e. first and last slices) could have a significant impact, especially on individual risk. Other factors such as strain persistence in the environment, disinfection practices, storage temperature and times, should also be included in a QMRA. Clearly, the pathogen type does affect $Tr(\%)$ and $Tr_T(\%)$. Moreover, the inoculum level on the blade influenced significantly the transfer of *S. aureus*, but not of *E. coli* O157:H7. An analysis of the most suitable model for incorporating transfer data into QRMAs was not clear-cut since both log-linear and Weibull models fitted the data describing the log-decrease of cells during slicing. However, the Weibull model showed a better fit for the first few slices where the risk of illness upon consumption is greatest. Inoculum levels used here were relatively high as compared to the concentrations usually found in real world. Ideally, they should be similar if transfer coefficients are influenced by inoculum level. In this sense, future research should consider the use of microbiological analysis with lower detection limits to better imitate real. Besides, other factors like the type of medium used to inoculate the blade or the contaminated area should be investigated regarding their effect on the transfer coefficient.

Acknowledgments

This work has been performed in the framework of the collaboration between the National Food Safety and Toxicology Center at Michigan State University and the University of Córdoba, and was partly financed by the MCYT AGL2005-119 and the Research Group AGR-170 HIBRO of the Plan Andaluz de Investigación (PAI).

2.6. References

- Anunciacao, L. L., Linardi, W. R., do Carmo, L. S. & Bergdoll, M. S. (1995). Production of Staphylococcal enterotoxin A in cream-filled cake. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 259-263.
- Beumer, R.R., & Kusumaningrum, H. (2003) Kitchen hygiene in daily life. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(4), 299-302.
- BgVV-FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses. 2000. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe: Spain. Seventh Report 1993–1998, Accessed at <http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/CRs/spa.pdf> in 20th June, 2006.

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

Bloomfield, S.F. (2003). Home hygiene: a risk approach. *International Journal of Hygiene Environmental Health*, 206, 1 – 8.

Chen Y., Jackson, K.M., Chea, F.P., & Schaffner, D.W. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross contamination rates in common foodservice tasks. *Journal of Food Protection*, 64, 72-80.

Codex Alimentarius Commission (CAC). (1999). Principles and Guidelines for the Conduct of Microbial Risk Assessment CAC/GL-30. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf . Accessed 25 February, 2006.

Cullen, A.C., & Frey, H.C. (1999). Probabilistic Techniques in Exposure Assessment. Plenum Press: New York. pp 73-74

Dickson, J.S. (1990). Transfer of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* between beef tissue surfaces. *Journal of Food Protection*, 53, 51-55.

Do Carmo, L.S., Cummings, C., Linardi, V.R., Dias, R.S., De Souza, J.M., De Sena, M.J., Dos Santos, D.A., Shupp, J.W., Pereira, R.K., & Jett, M. (2004). "A Case Study of a Massive Staphylococcal Food Poisoning Incident." *Foodborne Pathogens and Disease*, 4, 241–246

Dodd, C., Sanderson, M., Sargeant, J., Nagaraja, T., Oberst, R., Smith, R., & Griffin, D. (2003). Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feeds in Midwestern feedlots. *Applied of Environmental Microbiology*, 69, 5243–5247

Erginton, P.J., Holah, J., Allison, D.G., Handley, P.S., & Gilbert, P. (1998). Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Letters of Applied. Microbiology*, 27, 101-105

Fernández, A., Collado, J., Cunha, L.M., Ocio, M.J., & Martinez, A. (2002). Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 147-153.

Gorman, R., Bloomfield, S., & Adley, C. C. (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, 143-150.

Hernandez, G., Mangas, I., Mateo, S. de Liacer, A., Eiman, M., & Sanchez-Serrano, L.P. (1998). Foodborne disease outbreaks in Spain, 1988–1995: impact of an intervention measure. In Proceedings of the 4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications 7–12 June 1998, vol. 1. pp. 279–283. Berlin: Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine.

Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., & Beumer, R.R. (2002). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 227-236

Mackintosh, C.A., & Hoffman, P.N. (1984). An extended model of transfer of microorganisms via the hands: differences between organisms and the effect of alcohol disinfection. *Journal of Hygiene, Cambridge* 92, 345–355.

Mattick, K., Durham, K., Domingue, G., Jørgensen, F., Sen, M., Schaffner, D.W., & Humphrey, T. (2003). The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 213-226.

Midelet, G. & Carpentier, B. (2002). Transfer of Microorganisms, Including *Listeria monocytogenes*, from Various Materials to Beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4015-4024.

Montville, R., & Schaffner, D.W. (2003). Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. *Applied of Environmental Microbiology*, 69, 7188-7193

Montville, R., Chen, Y.H., & Schaffner, D.W. (2001). Glove barriers to bacterial cross contamination between hands to food. *Journal of Food Protection*, 64, 845-849

Moore, C.H, Sheldon, B.W., & Jaykus, L.A. (2003). Transfer of *Salmonella* and *Campylobacter* from Stainless Steel to Romaine Lettuce. *Journal of Food Protection*, 66, 2231-2236.

Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., & Baird, R.M. (2005). Essentials of the Microbiology of Foods. John Wiley & Sons Ltd. pp 241

Olkin, I., Gleser, L.J., & Derman, C. (1980). Probability Models and Applications. Macmillan Publishing Co., Inc, NY.pp. 276-285

Peleg, M. & Cole, M.B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Criteria Review Food Science*, 38, 353-380.

Perez-Rodríguez, F., Fuentes, J.M., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M., & Zurera, G. (2004). Transfer of *S. aureus* during cooked meat slicing. Paper presented at the COST 920,Pamplona, Spain.

Reij, M.W., Aantrekker, W.D., & ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 1-11.

Richard, J., & Piton, C. (1986). Semi-log model for interpreting the results of swabbing surfaces naturally contaminated. *Journal of Applied Bacteriology* 60:243-249.

Rörvik, L.M., & Granum, P.E. (1996). *Staphylococcus aureus*. In: Smittsamme sjukdommer fra mat, Granum PE (Red), Höyskoleforlaget, Kristiansand S, Norge, pp. 166-175 (in Norwegian).

Rusin, P., Maxwell, S., & Gerba, C. (2002). Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and phage. *Journal of Applied Bacteriology* 93: 585-592.

- Scott, E., & Bloomfield, S.F. (1990). The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands, and utensils. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 271-278.
- Tilden, J.J., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., & Morris, J.G.J. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American Journal of Public Health*, 86, 1142–1145.
- Veulemans, A., Jacqmain, E. and Jacqmain, D. (1970). Etude d'une méthode simple pour la détermination du degré de pollution des surfaces et la comparaison du pouvoir désinfectant de divers produits d'entretien. *Rev. Ferment. Ind. Aliment.* 25:58-65.
- Vorst, K.L., Todd, E.C., & Ryser, E.T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *Journal of Food Protection*, 69, 619-626.
- Vorst, K.L., Todd, E.C., Perez-Rodríguez, F., McMasters, R.L., & Ryser, E.T. (2004). Transfer of *Listeria monocytogenes* from a delicatessen slicer to ready-to-eat meat products. Paper presented at the IAFP's 91st Annual Meeting, Phoenix, AZ.
- Vose, D. (2000). Risk Analysis: A Quantitative Guide. John Wiley & Sons, Inc, New York, NY. pp 326.
- Wachtel, M.R., Mcevoy, J.L., Luo, Y., William Campbell, A.M., & Solomon, M.B. (2003). Cross-contamination of lettuce by *Escherichia Coli* O157:H7 via contaminated ground beef. *Journal of Food Protection*, 66, 1176-1183.
- Zhao, P, Zhao, T., Doyle, M.P., Rubino, J.M. & Meng, J. (1998). Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *Journal of Food Protection*, 61, 960-963.

3. Incorporación de modelos de contaminación cruzada en la ECRM y su impacto sobre la Gestión del Riesgo

El presente estudio desarrolla un enfoque para la aplicación de modelos de contaminación cruzada basados en la tasa de transferencia en la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano de los alimentos (ECRM) e ilustra una aplicación práctica de los Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO).

El modelo se dividió en dos etapas. La primera consistió en la confección y simulación de una serie de 9 escenarios de contaminación cruzada. Los escenarios representaron la contaminación desde un alimento crudo contaminado con *Listeria monocytogenes* a una loncha de productos cárnicos cocidos a través de su manipulación en el punto de venta, considerando como barreras de prevención frente a la contaminación, el uso de guantes y el lavado de manos, las cuales se definieron en el modelo a través de distribuciones de probabilidad. A continuación, en la segunda etapa, procedentes de la anterior (contaminación cruzada) fueron aplicados en un modelo de crecimiento para así obtener la concentración de *L. monocytogenes* en el momento de consumo después de una etapa de refrigeración a nivel de consumo doméstico.

El modelo matemático consistió en un modelo de primer orden, construido en Excel y simulado a través del Software @Risk de Palisade©.

Los resultados combinados con el FSO para *L. monocytogenes* (100 ufc/g) sirvieron para construir un ranking de riesgo, basado en el porcentaje de lonchas que en cada escenario superaron el citado FSO (análisis de percentil). Otro método alternativo, basado en el análisis de varianza, fue aplicado también, para identificar los escenarios de mayor riesgo; sin embargo, en este caso, el criterio utilizado fueron los valores de concentración en la loncha, y no el porcentaje de las mismas que superaron el FSO. Ambos análisis coincidieron, determinaron en primer lugar que el mayor riesgo estuvo basado en el uso de los mismos guantes para manipular ambos tipos de productos; y en segundo lugar, en que el escenario más seguro correspondió con aquel en el que se combinó, al mismo tiempo, el uso de diferentes guantes y lavado de manos. A pesar de ello, todos los escenarios simulados pudieron alcanzar valores de concentración final superiores a 10^8 ufc/g. Un análisis más específico sobre este aspecto concluyó que la transferencia de una sola célula puede ser relevante en el riesgo final, ya que ciertas combinaciones de temperatura y tiempo pueden producir grandes incrementos en la concentración de *L. monocytogenes* durante su refrigeración a nivel de consumo doméstico. Este resultado también nos indica que, en el caso de *L. monocytogenes*, es más importante para el riesgo su capacidad de transferirse al alimento que la cantidad transferida, puesto que a temperaturas de refrigeración *L. monocytogenes* puede crecer desde concentraciones muy bajas hasta alcanzar niveles de riesgo.

A través del presente estudio pudo ponerse de manifiesto la actual carencia de información relativa a la tasa de transferencia de *L. monocytogenes* y sus importantes consecuencias sobre la incertidumbre final de la ECRM. Por otro lado, el trabajo utilizó

técnicas de análisis “What-if” para evaluar posibles medidas de control. Como un ejemplo de aplicación de estas técnicas se empleó el escenario 2, que consistió en la transferencia de *L. monocytogenes* por manipulación a través de manos sin guantes y lavado de manos. Los resultados indicaron que el lavado de manos por sí solo no fue determinante en la disminución del riesgo, ya que es necesario un nivel de reducción del 80 % para poder reducir a la mitad el porcentaje de lonchas que superen el FSO.

Finalmente, como conclusión, el estudio destacó la aplicabilidad del diseño en escenarios para modelar los procesos alimentarios (contaminación cruzada), y así proporcionar respuestas más adecuadas y rápidas a las cuestiones de seguridad alimentaria.

El presente capítulo ha originado la siguiente publicación:

Linking Quantitative Exposure Assessment and Risk Management by means of the FSO concept: an example for *Listeria monocytogenes* in different cross-contamination scenarios

¹Pérez-Rodríguez, F., ²Todd, E.C.D., ¹Valero, A., ¹Carrasco, E., ¹García, RM^a., and ¹Zurera, G*.

¹Department of Food Science and Technology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, C-1, 14014 Córdoba, Spain

²National Food Safety & Toxicology Center, 165 Food Safety & Toxicology Building, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1314, U.S.A.

Journal of Food Protection Volume 69, Number 10, pp 3284-2394

Linking Quantitative Exposure Assessment and Risk Management by means of the FSO concept: an example for *Listeria monocytogenes* in different cross-contamination scenarios

3.1. Abstract

A practical approach was used to achieve specified Food Safety Objectives (FSO) by incorporating risk assessment methodology. A series of cross contamination scenarios at retail were evaluated in a spreadsheet and ranked according to their risk level, and the degree to which they exceeded a FSO for *Listeria monocytogenes* (100 CFU/g) was determined. Percentiles and analyses of variance were used to identify which scenarios would be most likely not to achieve the FSO. It was also possible to incorporate into the model the effect of additional risk management interventions (e.g., hand washing method) by using “what-if” scenarios analysis. The highest risk corresponded to the use of the same gloves to handle contaminated meat and then sliced ham compared with the safer method of using different gloves to handle each product. Nevertheless, in all scenarios bacterial concentration could be higher than 10^8 CFU/g. A significant lack of knowledge regarding the transfer rates of *L. monocytogenes* was revealed, which provided the model with an important uncertainty component. The “what-if” scenarios analysis based on the scenario representing handling with bare hands followed by hand washing (scenario 2) revealed that the hand washing procedure modeled in the present paper had less impact than expected. This study illustrates the use of scenarios to model the most effective food processes and thus provide risk managers with appropriate information on which to base their decisions.

3.2. Introduction

Quantitative Microbiological Risk Assessment is an innovative scientific approach that can be used to link data from food and human diseases to provide a clear estimation of the impact of contaminated food on public health (31) and assess the probability of illness from a pathogen in a given population. According to the framework for QMRA, defined by Codex Alimentarius Commission (8), Exposure Assessment (EA) is often the most complex and varied component to model because of the large number of potential scenarios, including the many types of cross contamination that can occur. Deli meats (cooked ham) contaminated with *Listeria monocytogenes* were used as an example in this study.

L. monocytogenes is a ubiquitous pathogen capable of surviving and growing under limiting conditions, such as low pH and temperature, high NaCl concentrations, or anaerobic conditions (12, 13). This microorganism is a major concern for food industries because the associated food-borne disease, listeriosis, has high mortality rates of 20-30% (30, 34). Most cases of human listeriosis appear to be sporadic,

although there have been well-documented outbreaks. Many of the sporadic cases may represent unrecognized common-source clusters (34). Contamination in food-processing and retail environments has been cited as a contributing factor in outbreaks and recalls. Thus, it is important to consider cross-contamination (3, 4, 15, 29, 34, 35, 40) in *L. monocytogenes* risk assessments.

A Food Safety Objective (FSO) specifies the maximum frequency and/or concentration of a microbiological hazard at the time of consumption that provides the Appropriate Level of Protection (ALOP) to the public. The FSO concept is the basis for the food safety management scheme proposed by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (9, 19). This scheme links the hazard analysis critical control point system, risk assessment and the task of pathogen risk management for consumer protection (33). However, the methodology required to integrate FSO in probabilistic and second order risk assessment is not sufficiently clear (14, 37).

The aims of this study are: i) to model in a spreadsheet the two main steps (handling and storage) that take place at retail and consumer levels, by describing different cross-contamination scenarios with cooked ham, and to model the potential for *L. monocytogenes* growth in domestic refrigerators and ii) to illustrate how risk assessment and FSOs can be linked to support risk management strategies.

3.3. Material and Methods

3.3.1. Scope of the model.

In the proposed model we quantified the effect of handling and storage on the contamination levels of *L. monocytogenes* in cooked ham at retail and consumer levels. In the first instance, the model describes the contamination of hands by contact with minced chicken meat that is contaminated with *L. monocytogenes* (wearing or not wearing gloves and washing or not washing hands) and subsequent cross-contamination from these contaminated hands to a cooked ham slice (including or not the use of gloves and hand washing). To model these scenarios, transfer rate distributions taken from both published and experimental data were combined, generating nine different cross contamination scenarios (Fig. 1). Growth of *L. monocytogenes* in the contaminated sliced ham during domestic storage was simulated with kinetic primary and secondary models, considering the temperature and time distributions and other deterministic factors (pH and water activity [a_w]). The resulting output of the model was the concentration of *L. monocytogenes* at time of consumption (N), expressed as log CFU per gram of sliced meat. For some intermediate calculations, it was necessary to transform the information back into arithmetic values; for example, cross contamination is an arithmetic process that cannot be described by logarithmic calculations. The general scheme of the model is reflected in the Figure 1. Statistical distributions, point-estimate values and literature sources used to describe the variables of the model are shown in Table 1

Table 1. Statistical distributions, point-estimate values and source used to describe the input variables for the exposure model of *L. monocytogenes* in different cross-contamination scenarios.

VARIABLE	UNITS	DISTRIBUTION/ POINT-ESTIMATE VALUE	SOURCE
Product to bare hands	lg[Tr(%)]	RiskNormal (0.94, 0.68); RiskTruncate (-0.44, 2)	Chen et al. (7)
Bare hands to product	lg[Tr(%)]	RiskNormal (0.12, 1.07); RiskTruncate (-2.5, 2)	Chen et al. (7)
Hand washing reduction	lg[Tr(%)]	RiskNormal (-0.2, 1.42); RiskTruncate (-3, 1.65)	Chen et al. (7)
Product to gloved hands	lg[Tr(%)]	RiskGamma (5.91, 0.4, RiskShift (-5))	Montville et al. (24)
Gloved hands to product	lg[Tr(%)]	RiskNormal (0.35, 0.88); RiskTruncate (-1.154, 1.534)	Montville et al. (24)
Gloves to product	Tr(%) *	RiskPert (0.14, 5, 23)	Perez-Rodriguez et al. (28)
Product to gloves	Tr(%)	RiskPert (0.15, 0.9, 99)	Perez-Rodriguez et al. (28)
Slice Size	grams	RiskPert (15, 40, 50)	Carretero Baeza et al. (5)
Temperature in domestic refrigerator	°C	RiskNormal (6.6, 2.2); RiskTruncate (0.9, 11.4)	Laguerre et al. (21)
Time in domestic refrigerator	Days	RiskCumulative (0, 14{3,7,10,14}{0.49,0.95,0.99,1})	American Meat Institute (1)
Preservative formulation in cooked ham products	-	pH = 6.35 Aw = 0.983	Anonymous (2)
Concentration of <i>L. monocytogenes</i> in minced chicken meat	lgCFU/g	RiskNormal (0.2, 1.19); RiskTruncate(, 4)	Inoue et al. (17)
Growth model parameters	-	$pH_{min} = 4.39$	te Giffel and Zwietering (38)
	-	$pH_{opt} = 7$	
	h ⁻¹	$\mu_{opt} = 2$	
	°C	$T_{min} = 1.5$	
	°C	$a_{wmin} = 0.92$	
-	°C	$T_{opt} = 37$	
-	-	$pH_{max} = 9.6$	

3.3.2. Modeling - Retail phase

Different handling procedures were modeled as potential sources of cross-contamination at the retail level (24). Minced raw chicken meat was used as the initial food source of *L. monocytogenes* because of the high contamination frequency of chicken carcasses (16, 18). A log-normal distribution of the concentration of *L. monocytogenes* in the chicken was determined from data obtained by Inoue et al. (17) (Table 1 and Fig. 2A). Then, different cross-contamination scenarios were surmised from food workers handling minced chicken and then handling ham slices, both with and without washing their hands and with or without gloves (Fig. 1). The typical ham slice sizes (grams) were estimated based on Carretero Baeza et al. (5). Data were described by a Beta-pert distribution (Table 1). This distribution is characterized for three parameters (minimum, maximum and most likely values), which can be derived from a set of data or expert opinion

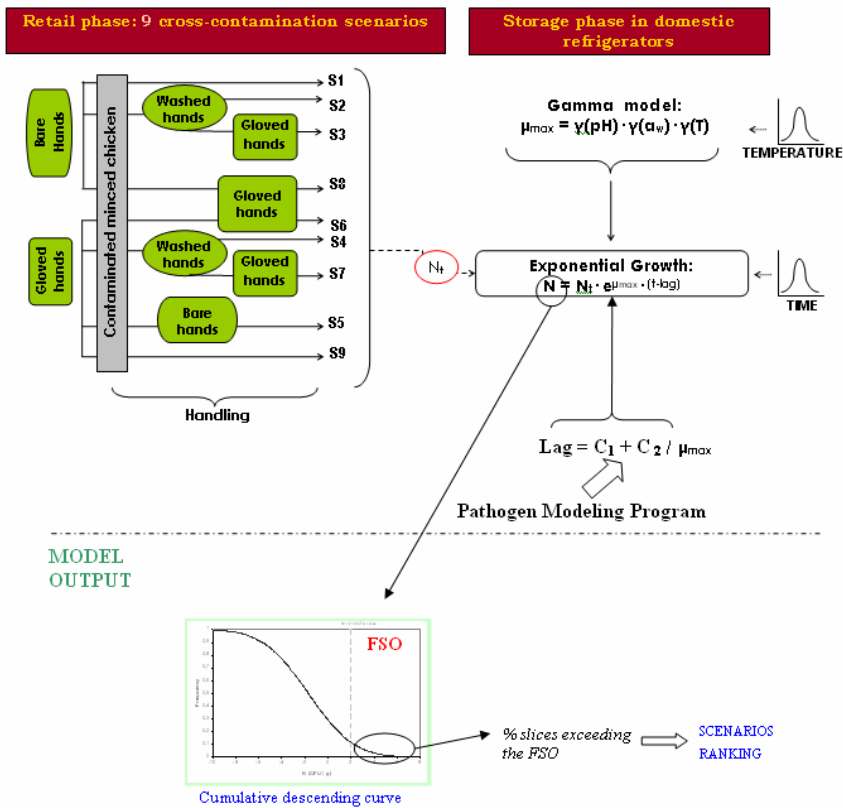


Figure 1. General scheme of the exposure assessment model describing cross-contamination scenarios and growth of *L. monocytogenes* at the retail and consumer level, respectively. The risk ranking was built up applying a Food Safety Objective (FSO) as target value for the model outcome.

Transfer rate distributions of *L. monocytogenes* cells between hands (bare or gloved) and cooked ham slices were determined from the studies of Chen et al. (7) and Montville et al. (24) (Table 1). These transfer rates data were obtained from experiments with *Enterobacter aerogenes* instead of *Listeria* while performing activities other than those included in this paper (not handling sliced meat); therefore transfer rate distributions represented variability and uncertainty. Montville and Schaffner (25) noted that the type of activity performed when handling food probably influences transfer rates and these differences could be attributed to the use of different initial inoculum concentrations. Because the real contamination levels are seldom high, the transfer rate distribution used here to describe the transfer from hand to slice was that obtained by Montville et al. (24) at low inoculum concentrations. No biofilm formation was assumed because of the short contact time in the various cross-contamination scenarios.

Transfer rates corresponding to cross contamination between minced chicken meat and cooked ham slices (scenario 9) via the same gloves were based on assays with *L. monocytogenes* performed in our laboratory (28) (data not shown). These

transfer rates were included in the model by means of a Beta-Pert distribution (Table 1). Based on expert opinion, a higher probability was assigned to the low values in the distribution by using a smaller most likely value. Maximum and minimum values were taken from experimental data. The maximum transfer rates (99 %) were similar to those obtained by Chen et al. (7) and Montville et al. (24) for transfer between bare hand and product in both directions. In our model, we included the variability of washing efficacy among workers at the retail level by incorporating the distribution of Chen et al. (7), who used *Enterobacter* data obtained from hand-washing experiments in the laboratory (Table 1), through a sequential process of hand-washing and drying. The reduction rate is expressed as the percentage of CFU removed from hands during hand washing and drying.

The output obtained for each scenario was the number of *L. monocytogenes* transferred to a cooked ham slice (Fig. 1), calculated from the simple expression:

$$N_t = 10^{N_o} Tr / 100 \quad (1)$$

where: N_t is the number of bacteria transferred (CFU per gram of slice), Tr is transfer rate representing the overall scenario (%) and N_o is the initial concentrations of *L. monocytogenes* for the contamination source (log CFU per gram)

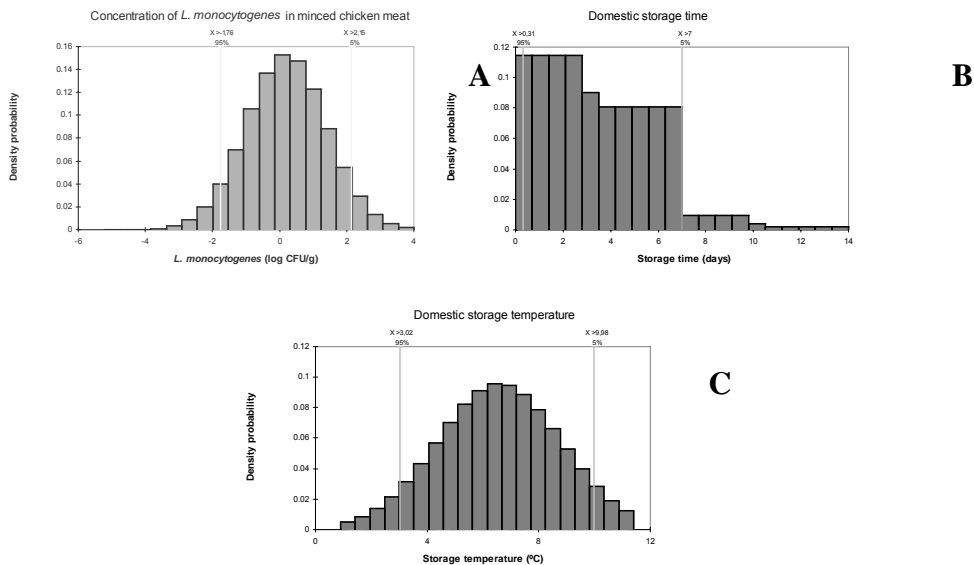


Figure 2. (A) Frequency distribution of *L. monocytogenes* concentration (log CFU per gram) in minced raw chicken meat by using data taken from the study of Inoue et al. (17). (B) Frequency distribution of storage time (day) of cooked ham slices in domestic refrigerator, taken from U.S. Food and Drug Administration (41) (C) Frequency distribution of storage temperature (°C) in domestic refrigerator, taken from Laguerre et al. (21).

3.3.3. Modeling Storage phase

The output from the cross-contamination scenarios at the retail level expressed as CFU per gram was combined with the distributions of storage time (41) and temperature in domestic refrigerators (21) (Fig. 2B and 2C).

The predictive model for the growth rate of *L. monocytogenes* was taken from the study of te Giffel and Zwietering (38), which takes into account the effect of a_w , pH and temperature (Fig. 1):

$$\mu_{max} = \gamma(pH) \cdot \gamma(a_w) \cdot \gamma(T) \cdot \mu_{opt} \quad (2)$$

Where: μ_{opt} is the growth rate per hour under optimal conditions and

$$\gamma(T) = \left(\frac{T - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}} \right)^2$$

$$\gamma(a_w) = \frac{a_w - a_{w\ min}}{1 - a_{w\ min}}$$

$$\gamma(pH) = \frac{(pH - pH_{min}) \cdot (pH_{max} - pH)}{(pH_{opt} - pH_{min}) \cdot (pH_{max} - pH_{opt})}$$

were $a_{w\ min}$, pH_{min} and T_{min} are the values of water activity, pH and temperature, respectively, below which no growth occurs; pH_{opt} and T_{opt} are the pH and temperature, respectively, at which the growth rate is maximal; pH is the pH for cooked ham; a_w is the water activity for cooked ham, and T is the distribution of domestic refrigerators temperatures (Table 1).

The growth model was combined with a simple lag time model (secondary model) presented by Cassin et al. (6), which was fitted to data taken from the Pathogen Modeling Program for Windows (version 7.0) for the range of factors considered in the product:

$$Lag = C_1 / \mu_{max} + C_2 \quad (3)$$

where: Lag is the lag time (in hours), μ_{max} is the maximum growth rate (per hour), and C_1 and C_2 are regression parameters

Water activity and pH were described by point-estimate values derived from the known formulation of cooked ham (2) (Table 1). The temperature distribution in domestic refrigerators was based on data from French homes (21) (Table 1 and Fig. 2C) because they better represent the Spanish situation. The distribution for the storage time was taken from U.S. Food and Drug Administration (41) and the American Meat Institute (1) (Table 1 and Fig. 2B) because of the lack of any equivalent Spanish data. The model developed assumed that *L. monocytogenes* does

not grow below 4°C on ham. Most published growth models (10, 43) make predictions at temperatures $\geq 4^\circ\text{C}$ because predictions only for temperatures $\geq 4^\circ\text{C}$ because predictions $<4^\circ\text{C}$ are normally erratic and unreliable (22). *L. monocytogenes* concentration at the time of consumption was calculated through the exponential growth function, which combines the outcomes from the growth rate and lag time models as follows:

$$N = N_i \cdot e^{\mu_{\max} \cdot (t - \text{lag})} \quad (4)$$

where N is the concentration of cells at the time of consumption; N_i is the concentration of cells at the beginning of the exponential growth phase (N_i); μ_{\max} is the maximum growth rate per hour, t is the distribution of published storage time in domestic refrigerators (1); lag is the lag time in hours.

Many risk assessment studies have included considerations of the relationship between storage temperature and time: Spoilage actions determine consumer behaviour, giving rise to shorter storage times at higher storage temperatures. However, few studies have generated results that describe accurately the relationship between both factors based on real data. Owing to the lack of data, an initial analysis was carried out using the Spearman's Rank Order Correlation in the @Risk programs to establish different association levels representing qualitatively non-dependence (0), low dependence (-0.25), medium dependence (-0.50), and high dependence (-0.75) between storage time and temperature (42). The outcomes from every scenario were analysed for each correlation coefficient simulated. Time and temperature combinations obtained from the simulation were graphed for each correlation value and analysed visually (Fig. 3). During our studies in the laboratory with cooked meat (32), we did not observe any organoleptic deterioration (based on a sensory analysis) during a period of 18 days at 12°C (above maximal values in the present model), in agreement with the results obtained by Samelis et al. (36). Thus, consumer behaviour would not be strongly affected by extreme combinations of both factors. Consequently, the correlation to be applied should describe low dependence. Because of the lack of data on the dependency between these two factors, a conservative approach (low dependency) seemed appropriate. Therefore, based on the above analysis, a low correlation coefficient was chosen, -0.25, at which the highest temperatures (10-11.4°C) occurred mostly within 0 to 5 days (Fig. 3B).

The maximum population density (MPD) of bacteria reached in cooked ham slices largely depend on temperature. To include this factor into the model, a logical expression was used (41):

$$\text{If } [T < 5^\circ\text{C}; 5 \log (\text{CFU/g}); \\ \text{If } (T < 7^\circ\text{C}; 6.5 \log (\text{CFU/g}); 8 \log (\text{CFU/g})] \quad (5)$$

A logarithm range of variability was supposed for MPD, which was included in the model by using a uniform distribution (MPD-0.5, MPD+0.5).

Because bacteria are discrete entities, the application of transfer rates in the model could in some cases lead to an unrealistic risk characterisation (26), i.e., 0.1 CFU per slice means 1 CFU every 10 slices in the simulation and not 0.1 CFU in one

slice (iteration), which is biologically impossible. Therefore, assuming that bacteria are distributed homogenously in the food matrix (binomial process), an exponential distribution was used to determine the probability that one slice has at least one bacterium. The exponential distribution was defined by the product of the slicing size (grams) and bacterial concentration (CFU per gram): $p(x \geq 1) = 1 - \exp(-C \cdot S)$, where C is the concentration (CFU per gram) and S is the serving size (grams). This probability was included in a discrete distribution to determine the presence or absence of bacteria in each slice or iteration in the simulation.

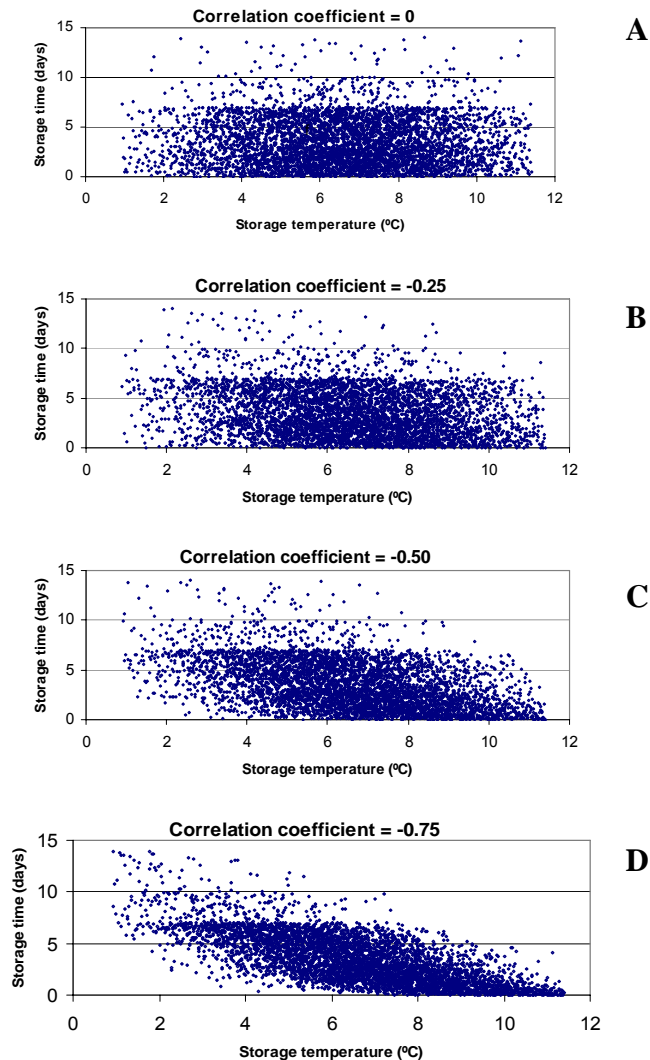


Figure 3. Scatter plots representing the storage temperature and time combinations when correlation between both input variables are fixed in the simulation at (A) 0 (non-dependence); (B) -0.25 (low dependence); (C) -0.5 (medium dependence); (D) -0.75 (high dependence).

3.3.4. Building up a risk ranking of the scenarios by applying a FSO

Once the concentration of *L. monocytogenes* in food at the time of consumption (N) has been calculated, it is possible to obtain the percentage of products that exceed an established FSO. The FSO used in this study was proposed by the European Commission Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health (11), which considered the FSO for *L. monocytogenes* to be 2 log CFU/g at consumption. From this limit, the simulated frequency distributions of N (log CFU per gram) for each scenario were obtained, and the percentage of slices with $N > 2 \log \text{CFU/g}$ was calculated (Fig. 1). According to these percentages, the scenarios that exceeded the FSO were ranked from highest to lowest.

3.3.5. Simulation Analysis

The exposure assessment model did not include a separation between the variability and uncertainty of input variables (first order model). The model was simulated using the Latin-Hypercube Technique, implemented in @Risk Professional® software (Palisade, Newfield, NY). The simulation was run using 100,000 iterations for each scenario.

A Tornado analysis based on the Spearman's Rank Order Correlation Coefficient was performed to evaluate the influence of different input variables on the final output of the model, N (log CFU per slice). The coefficient values oscillate between -1 and 1, whose extreme values correspond to perfect negative and positive correlation, respectively, between variables. If a zero value is obtained, non-correlation exists between variables. Strictly speaking, this analysis illustrates the level to which the variance (uncertainty and/or variability) in the output of the model is affected by variances in the individual variables used in the model. Therefore, based on this criterion, the most significant input variables can be identified (6). However, the significant variables identified in this analysis are not necessarily the parameters that have the greatest effect on output level.

3.3.6. Statistical Analysis

Descriptive statistics of the data obtained during simulation were calculated using Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Wash.). Differences between scenarios were examined by performing nonparametric variance analysis (Kruskal-Wallis test, significance at $p < 0.05$) on a subset of N (log CFU per gram) of 2000 slices taken randomly from the simulation outcome in all the scenarios. A Sheffe test ($p < 0.05$) was performed on the same data set, which allowed the formation of homogenous groups by an association of scenarios with concentrations that were statistically similar. This analysis was carried out using Statistica 5.5 Software (Statsoft, Tulsa, Okla).

3.3.7. Applying the ICMSF food safety management scheme

In the management scheme proposed by the International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF) (19), cumulative increases (I) and reductions (R) associated with a biological hazard along the food chain starting from an initial concentration (H_0) can be expressed as:

$$H_0 - \Sigma R + \Sigma I \leq FSO \quad (6)$$

This simple expression provides a conceptual means of establishing and assessing the effect of control measures in conjunction with performance and process criteria to achieve an established FSO. Although this expression might be considered too simplistic for complex food control situations (23), it was considered adequate to illustrate an approach to finding out the degree to which an FSO might be achieved.

By following this scheme, the variables and parameters of the cross-contamination model were converted into I or R terms (equation 6). For example, hand washing is considered a reduction process (R), and transfer from bare or gloved hand to slices can be seen as an increase (I).

3.4. Results and discusión

3.4.1. Outcome of the Model

The model outcome was the distributions of N (log CFU per gram) for every scenario. Figure 4 shows the frequency distributions of N (log CFU per gram) at the time of consumption for each scenario. Table 2 contains the main descriptive statistics (mean, standard deviation, 95% percentile and maximum) of the distribution of N for all scenarios.

3.4.2. Performing a risk ranking

A risk ranking was created for the nine scenarios. The ranking criterion was the percentage of slices containing > 2 log CFU/g, using the N (log CFU per gram at consumption) distribution for each scenario. Hence, the scenarios were ranked from high percentage (major risk) to low percentage (minor risk), as shown in Table 2. Scenario 9 (using the same gloves) was reported to be the most risky scenario, with a risk of 5.73 %. Scenarios including handling of contaminated chicken meat with bare hands (scenarios 8, 3, 1 and 2) had the second highest percentages (around 3.5%). The other scenarios had risk below 0.10%. The lowest risk was for scenarios 6 and 7, which included the use of different pairs of gloves. However, in all scenarios high concentrations, i.e. ≥ 8 log CFU per slice were reached because of the extensive growth resulting from relatively extreme combinations of time and temperature during storage (e.g. 9.8°C for 12days), which occurred occasionally in the simulation. This extensive growth was responsible for the similarities found between scenarios, e.g., scenario 1 and 2 (Table 2 and Fig. 4).

3.4.3. Differences in the concentration level (*N*) between scenarios

Significant differences ($p < 0.000$) between the nine scenarios were found using a Kruskal-Wallis test (non-parametric analysis of variance). According to the Scheffé test ($p < 0.05$), these scenarios fell into four homogeneous groups (Table 2). The highest risk group was scenario 9, (using the same gloves for handling contaminated meat and ham slices), with a mean of more than $-2 \log \text{CFU/g}$.

Table 2. Summary of statistics from the distribution of *N* ($\log \text{CFU}$ per slice) at consumption and results of the simulation of each scenario and risk ranks of scenarios according to the percentage of slices above the FSO for *L. monocytogenes* ($2 \log \text{CFU/g}$).

Nº	Scenario	Mean	$\pm \text{SD}^1$	95 th Percentile	Maximum	% slice > 2 $\log \text{CFU/g}$ (FSO)	Ranking
1	Contaminated meat-bare hands-slice	-2.57 ^c	2.13	1.34	8.49	3.42	4
2	Contaminated meat-bare hands-washing-slice	-2.59 ^c	2.13	1.36	8.49	3.38	5
3	Contaminated meat-bare hands-washing-gloved hands-slice	-2.32 ^b	2.01	1.40	8.50	3.53	3
4	Contaminated meat-gloved hands-washing-bare hands-slice	-6.40 ^d	1.85	-3.40	8.47	0.10	7
5	Contaminated meat-gloved hands-bare hands-slice	-6.38 ^d	1.85	-3.39	8.47	0.11	6
6	Contaminated meat-gloved hands-gloved hands-slice *	-6.15 ^d	1.85	-3.36	8.47	0.09	8
7	Contaminated meat-gloved hands-washing-gloved hands-slice	-6.16 ^d	1.71	-3.37	8.49	0.08	9
8	Contaminated meat-bare hands-gloved hands-slice	-2.29 ^b	2.01	1.43	8.50	3.58	2
9	Contaminated meat-gloved hands-slice **	-1.51 ^a	1.99	2.22	8.50	5.73	1

^c Different pair of gloves is used to handle both chicken meat and cooked ham slices

^{**} The same gloves are used to handle both chicken meat and cooked ham slices

¹ Standard Deviation of the *N* ($\log \text{CFU/slice}$) distribution

^{a b c d} Homogenous groups reported by Scheffe test at a p -value of < 0.05

The second group included scenarios 3 and 8 (handling the contaminated meat and then ham slices with bare hands and gloved hands, respectively, with or without hand washing), with a mean of approximately $-2.30 \log \text{CFU/g}$. The third group included the scenarios 1 and 2 (in which bare hands are used to handle both contaminated meat and ham slices, with or without hand washing, respectively), with a mean of around $-2.50 \log \text{CFU/g}$.

The last group included the scenarios that represented the use of gloves when handling contaminated meat (scenarios 4, 5, 6 and 7), with means of around $-6 \log \text{CFU/g}$. It is of particular notable that scenario 9 had the highest concentration levels, denoting that the use of the same gloves to handle raw meat and ready-to-eat products might carry a higher risk of cross-contamination than other scenarios that are expected to be more risky, such as scenarios 1 and 2 (handling with bare hands and washed hands).

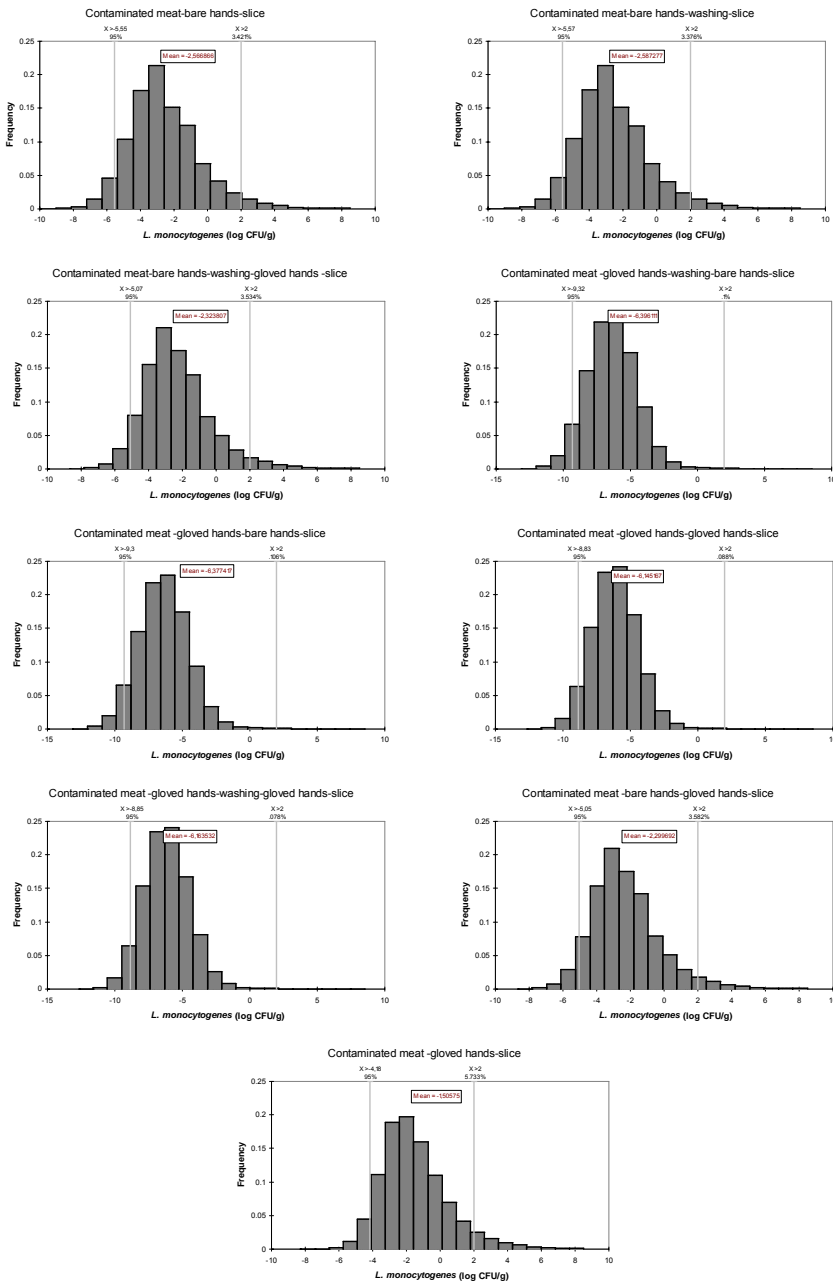


Figure 4. Simulated distribution of *L. monocytogenes* (log CFU/g) at the time of consumption (N) for the nine scenarios.

These results should be treated with caution because the data used to build the transfer rates distribution for this scenario were taken from experiments with *L. monocytogenes* instead of *Enterobacter*, which was used for the rest of scenarios. Kusumaningrum et al. (20) reported that there were no significant differences between species for transfer rates. However, the surprising lower concentration for scenarios 1

and 2 compared with that for scenarios 3 and 8, according to the statistical test, was due to the differences in sampling (simulation) of the exponential and discrete distributions (determining presence or absence of *Listeria* in each slice or iteration) in each scenario, thus canceling out the slight differences between these scenarios. The results of the risk ranking for these scenarios were affected by the same technical issue. Aside from statistical analysis, it seems reasonable to consider scenarios 1, 2, 3 and 8 (use of bare hands when handling contaminated meat) in the same risk group.

3.4.4. Efficacy of Hand-Washing versus Use of Gloves

The results of these simulations suggest that reduction of *L. monocytogenes* through hand washing followed by bare-hand contact with food (scenario 2) is not sufficient to assure that the FSO will not be exceeded. The use of disinfection procedures after drying hands and before handling food coupled with training programs, may improve the likelihood that the FSO will be achieved. However, scenario 7 indicated that a combination of gloves and proper hand washing is the most effective procedure; only 250 of the 100,000 slices (in the simulation) were contaminated (0.25%). The use of gloves when handling contaminated raw meat led to lower risks regardless of the type of barrier used when handling ready-to-eat products (cooked ham) as long as different gloves were used. Even when gloves are used, hands should be washed with an effective sanitizer before gloves are put on to reduce the chances of cross contamination (27).

3.4.5. Significant variables in the scenarios

To consider the effect of the model variables (inputs) on N (log CFU per gram) (output), and because of the high number of scenarios, some of the most representative scenarios, including the riskiest and safest scenarios (1, 2, 7 and 9, Table 2), were chosen for a sensitivity analysis. Tornado graphs (Fig. 5) indicate the levels of association between the model inputs and output based on Spearman's Rank Order Correlation Coefficient, accounting for the degree to which output variance (uncertainty and/or variability) is affected by input variance.

The Tornado analysis indicated that several factors had a significant effect on bacterial concentration distribution (log CFU/g per gram at consumption). The main variables were (i) presence of bacteria on the slice and contamination source (contaminated minced chicken meat), (ii) transfer or reduction rates, and (iii) storage time and temperature. The "presence" of *Listeria* on the slice (after contaminating the slice) was considered an intermediate input, which was derived from the exponential and discrete distribution by determining whether or not *Listeria* is present in the slice, based on a binomial process. Its appearance on the top of the Tornado graphs can be considered to be a technical contrivance in the @Risk model and not a real input. However, it should be highlighted because it demonstrated that the presence or absence of *Listeria* on the slice had great impact on the output distribution variance. Hence, the contamination source was the most variable factor and was correlated with the concentration of *Listeria* at the time of consumption (N) in the scenario

representing contamination from the use of different pairs of gloves (0.7, Fig. 5C) and hand washing and in the scenario representing the use of the same gloves without hand washing (0.8, Fig. 5D). Similarly, transfer rates had a similar effect in all the scenarios analysed, for which correlation coefficients ranged between 0.57 and 0.20 (Fig. 5A and D, respectively). Temperature, time and washing hand had lower correlation coefficients (<0.1).

In first-order models, Tornado analysis might be of use, from a qualitative point of view, by identifying significant sources of uncertainty in the model (42). If an input distribution clearly shows an important uncertainty component (e.g., measure errors, low sensitivity, few data, etc.) and, in addition, presents a high correlation coefficient, this input may be recognized to be a significant source of uncertainty in the model. This application of Tornado analysis can be illustrated in the present study with the transfer rate distributions taken from Chen et al. (7) and Montville et al. (24). These studies are bound to have an important uncertainty component caused in part by the limitations of sampling techniques for surfaces (4) and by the fact that the distributions were generated using *Enterobacter* data. Therefore, the high correlations indicate that these inputs were both a significant source of variability and a significant source of uncertainty in the present model. However, care should be taken by risk assessors and managers not to place too much faith in the validity of this application of Tornado analysis because the validity largely depends on the reliability of the assumption of uncertainty for the input variable is.

3.4.6. Establishing an effective reduction rate for hand washing procedures.

Hand washing procedures can be considered an imperfect reduction step (R_w) for achieving FSOs ($H_0 - \Sigma R + \Sigma I < \text{FSO}$). Managers might be interested to know the R_w needed to reduce the percentage of slices with $N > 100$ CFU/g (FSO). Although R in the ICMSF scheme is expressed in logarithmic form, some processes cannot be described logarithmic form, some processes cannot be described logarithmically (e.g., cross contamination and removal process, etc) (23, 39, 44). Thus, R_w was defined as the percentage (%) of bacteria removed from hands by hand washing procedures. For instance, if hands are contaminated with 100 bacterial cells, a hand washing procedure with 20% reduction rate will result in an elimination of 20 cells, and 80 cells will remain on the hands. Each hand washing procedure would be associated hypothetically with a certain reduction rate depending on the method used (e.g., antimicrobial soap, drying method or training level of workers). For this purpose, a Monte-Carlo analysis was carried out on this variable based on scenario 2 (Table 1). Thus, the R_w for the hand washing procedure was fixed at different values (10, 20, 50, 60, 70, 80 and 90 %), and the output of the model (% slice $N > 100$ CFU/g) was observed. A reduction rate of around 80 % would be necessary from hand washing to more than halve the percentage of *L. monocytogenes* on slices at $N > \text{FSO}$ (i.e., 6.36 to 3.00 %) (Fig. 6). These results suggest that reduction by hand washing would not have an marked impact on the percentage of slices at $N > \text{FSO}$, because although few bacteria would remain on hands, even if only one bacterial cell was transferred to the ham slice, the bacterial population could reach levels that exceeded the FSO due to growth during domestic storage. To prove such a statement, a “what-if” scenario

was evaluated in which the number of cells transferred to the slice was fixed at 1 CFU/slice (0 log CFU/ slice) and the time and temperature distributions were allowed to vary. The analysis of *N* distribution (log CFU per gram at consumption) revealed that around 8% of slices exceeded the FSO.

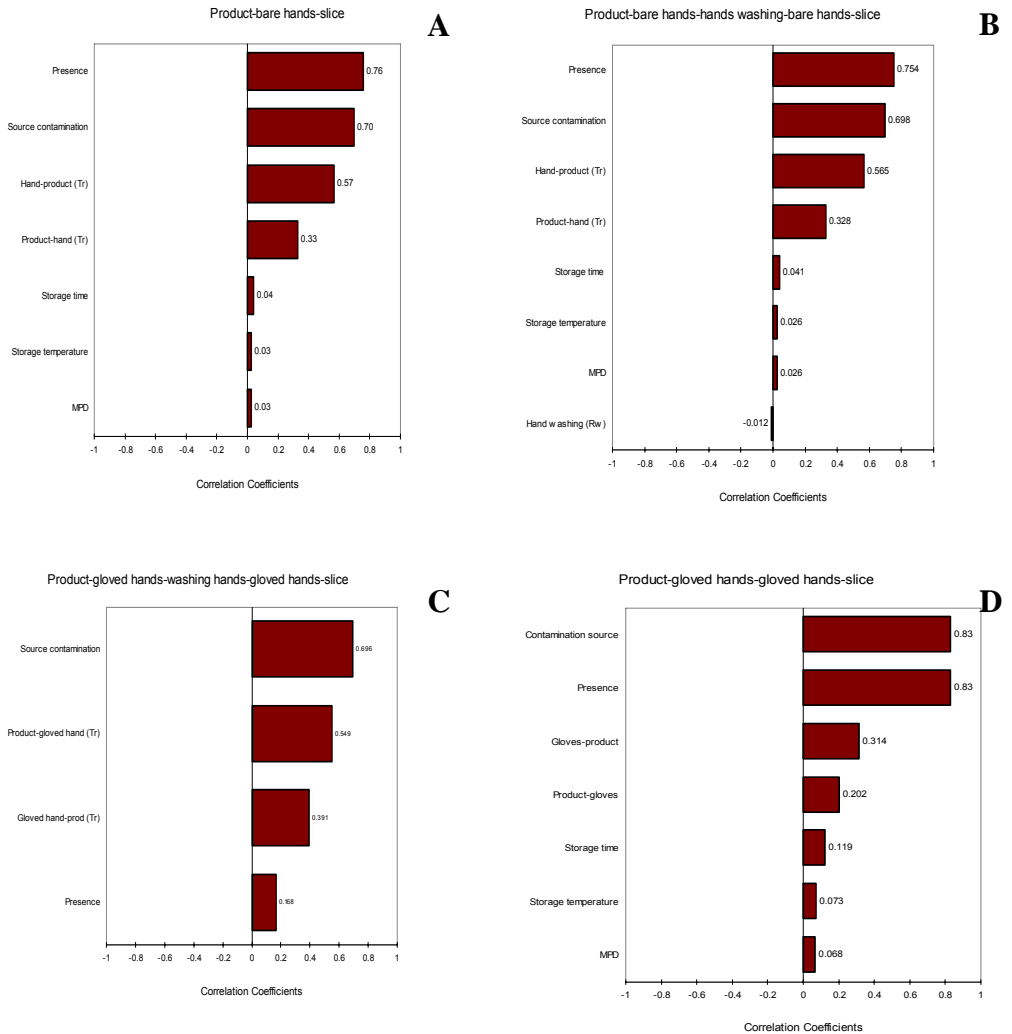


Figure 5. Tornado graphs of the scenarios (A) 1 (contaminated meat to bare hands to slice), (B) 2 (contaminated meat to bare hands to washing hand to slice), (C) 7 (contaminated meat to gloved hands to washing hands to gloved hands to slice) and (D) 9 (contaminated meat to gloved hands to slice). The significance degree is ranked from top to bottom. The presence variable refers to the binomial sampling process described by means of the exponential and discrete distributions that determine the presence or absence of *L. monocytogenes* on the slice after cross-contamination. The Tr variables correspond to transfer rate distributions. The contamination source variable is the concentration of *L. monocytogenes* in minced raw chicken meat. Longer bars indicate a high correlation between input variable and output (N).

From a management point of view, these findings suggest that consumer behavior at home (domestic storage temperature and time) can have a significant impact on the percentage of ham slices exceeding the FSO; hence, changes in consumer behavior could help to reduce risk levels. However, storage temperature and time (at home) are not controllable by regulations, and must be addressed by appropriate educational programs for consumers. The efficacy of such programs depends on quality and dissemination and on whether the objective established (e.g., home refrigerator temperatures below 7°C) is effective and feasible. These issues can be addressed by performing probabilistic risk assessment for food groups instead of specific food products, and applying “what-if” scenarios and sensitivity analysis.

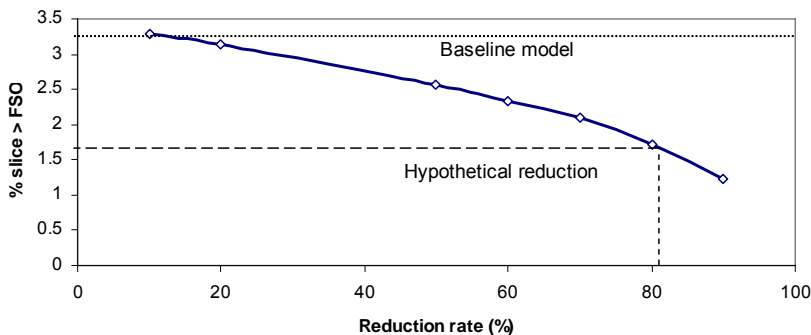


Figure 6. Solid line indicates the fixed reduction rates for hand washing procedure of the scenario 2 plotted against the percentage of slices with $N > 2 \log \text{CFU/g}$ obtained in each simulation (“what-if” scenarios). The dotted line shows the baseline percentage of slices with $N > 2 \log \text{CFU/g}$. The dashed line indicates that the reduction rate leads to a drop of 50% in the percentage of slices with $N > 2 \log \text{CFU/g}$ with respect to the baseline result

3.5. Conclusions

The approach taken in this study is a relatively easy way of evaluating the safety of a process within set guidelines. The process includes integrating risk assessment methodology, quantitative mathematical modeling, and a risk management goal such as setting FSOs. Exposure assessment models in spreadsheet format allow the comparison of different processes and handling scenarios. Scenario analysis can help stakeholders and managers choose the most appropriate processing and handling option for a particular food product. The model also illustrated how to identify the sources of uncertainty present in the scenarios in a simple and qualitative way and thus can provide managers with feedback that will allow them to reduce these uncertainties through surveys and research. However, if greater accuracy is required regarding sources of uncertainty and how they affect output uncertainty, a second-order model approach should be carried out by improving the quality and quantity of data.

This study also revealed the lack of suitable transfer rate data for cross contamination models of *L. monocytogenes*. An unquantifiable uncertainty came from certain assumptions and surrogate distributions used for *Listeria* transfer rates.

However, models can be a helpful basis for risk management when decisions must be made, even when the models are not complete, as long as the assumptions are taken into account in decision-making process. Validation and new data are needed to refine the models process and to generate second order models.

Acknowledgments

This work has been performed as a collaboration between Michigan State University and University of Córdoba, and was partly financed by the MCYT AGL2005-119 and the Research Group AGR-170 HIBRO of the Plan Andaluz de Investigación (PAI).

3.6. References

1. American Meat Institute. 2001. Consumer handling of RTE meats. (unpublished data submitted to Docket No. 99N-1168).
2. Anonymous. 1996. Specific task for scientific cooperation (SCOOP). Council Directive 93/5/EEC. Studies relating to temperature control. European Commission, Luxembourg.
3. Bell, C., and A. Kyriakides, 2002. *Listeria monocytogenes*, p337-361. In Blackburn, C. de W., and McClure, P.J. (ed.), *Foodborne Pathogens – Hazards, Risk Analysis and Control*. Woodhead Publishing, Cambridge.
4. Bloomfield, S.F., M. Arthur, B. Van Klingerren, W. Pullen, J.T. Holah, and R. Elton, 1994. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfection. *J. Appl. Bacteriol.* 17: 86-94
5. Carretero Baeza, M^a. L., M^a.D. Gómez Vázquez, R. Lopez-Tarruella Bautista, and L. Suárez González. 1994. Estudio CAENPE, pp. 56-58. In *Consumo de Alimentos y Estados Nutricional de la Población Escolar de la Comunidad Autónoma de Madrid*. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
6. Cassin, M.H., M. Lammerding, E.C.D. Todd, W. Ross, and R.S. McColl. 1998. Quantitative Risk Assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 21-44
7. Chen Y., K.M. Jackson, F.P. Chea, and D.W. Schaffner. 2001. Quantification and variability analysis of bacterial cross contamination rates in common foodservice tasks. *J. Food Prot.* 64: 72-80.
8. Codex Alimentarius Commission. 2005. Report of the thirty-seventh session of the Codex Committee on Food Hygiene ALINORM 05/28/13. Draft Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Management at step 5. Available at: http://codexalimentarius.net/download/report/638/a128_13e.pdf. Accessed April 2005.
9. Codex Alimentarius Commission. 1999. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbial Risk Assessment CAC/GL-30. Available at:

http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf.

Accessed 15 April 2005

10. Devlieghere F., A.H. Geeraerd, K.J.Versyck, B.Vandewaetere, J. Van Impe and J. Debevere. 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiol.* 18: 53-66.
11. European Commission. 1999. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. Available at: http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf. Accessed 2 April 2005.
12. Fenlon, D.R., J. Wilson, and W. Donachie. 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 641-650.
13. Garrec, N., F. Picard-Bonnaud, and A.M. Pourcher. 2003. Occurrence of *Listeria sp.* and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 275-283.
14. Havelaar, A.H., M.J. Nauta and J.T. Jansen. 2004. Fine-tuning Food Safety Objectives and Risk Assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 11-29.
15. Hudson, W.R., and G.C. Mead. 1989. *Listeria* contamination at a poultry processing plant. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 211-214.
16. Hudson, J.A., and S.J. Mott. 1993. Presence of *Listeria monocytogenes*, motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* in environmental samples taken from a supermarket delicatessen. *Int. J. Food Microbiol.* 18: 333-337.
17. Inoue S., A. Nakama, Y. Arai, Y. Kokubo, T. Maruyama, A. Saito, T. Yoshida, M. Terao, S. Yamamoto, and S. Kumagai. 2000. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 73-77.
18. International Commission on Microbiological Specification for Foods. 1996. Microorganisms in Food 5: Characteristics of Microbial Pathogens. Aspen Publishers, Inc, Frederick, MD.
19. International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). 2001. Microorganisms in Food 7: Microbiological Testing in Food Safety Management, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
20. Kusumaningrum, H.D., G. Riboldi, W.C. Hazeleger, and R.R. Beumer. 2002. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 227-236
21. Laguerre, O., E. Derens, and B. Palagos. 2002. Study of domestic refrigerators temperature and analysis of factors affecting temperature: a French survey. *Int. J. Refrig.* 25: 653-659

22. Le Marc, Y., C. Pin, and J. Baranyi. 2005. Methods to determine the growth domain in a multidimensional environmental space. *Int. J. Food Microbiol.* 100: 3-12
23. McMasters R.L., and E.C. Todd. 2003. Modeling growth and reduction of microorganisms in foods as functions of temperature and time. *Risk Anal.* 24: 409-414
24. Montville, R., Y. H. Chen, and D. W. Schaffner. 2001. Glove barriers to bacterial cross contamination between hands to food. *J. Food Prot.* 64: 845-849
25. Montville, R., and D.W. Schaffner. 2003. Inoculum Size Influences Bacterial Cross Contamination between Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7188-7193
26. Oscar, T.P. 2004. A quantitative risk assessment model for *Salmonella* and whole chickens. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 231-247
27. Paulson, D.S. 1996. To glove or to wash: a current controversy. *Food Qual. June/July*: 60-64
28. Pérez-Rodríguez F., E. Carrasco-Jiménez, A. Valero-Díaz, R.M. García-Gimeno and G. Zurera-Cosano. 2004. Looking for solutions for not available data in exposure assessment in cooked meats. COST920 WG3 workshop, June 28-30 2004 Spain. Available at <http://www.cost920.com/Perez.pdf>. Accessed 2 April 2005
29. Reij, M.W., W.D. Aantrekker, and ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 1-11.
30. Rocourt, J. 1996. Risk factors for listeriosis. *Food Control.* 7: 195-202.
31. Rocourt, J., P. BenEmbarek, H. Toyofuku, and J. Schlundt. 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 263-267.
32. Rodríguez-Pérez, M^a.R., G. Zurera-Cosano, R.M^a. Garcia-Gimeno, E. Barco-Alcalá, and A.M^a Castillejo-Rodriguez. 2003. Sensorial and microbiological quality evaluation of vacuum-packed sliced cooked chicken breast. Shelf-life estimation. *J. Food Qual.* 26: 105-122.
33. Ross, T., and T. McMeekin. 2002. Risk assessment and pathogen management, pp. 97-123. In C. de W. Blackburn and P. J. McClure (ed). Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
34. Ryser, E.T. 1999. Foodborne listeriosis, p. 299-358. In: E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 2nd Edition, Marcel Dekker, New York.

35. Salvat, G., M.T. Toquin, Y. Michel, and P. Colin. 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. *Int. J. Food Microbiol.* 25: 75-81
36. Samelis, J., A. Kakouri, K.G. Georgiadou and J. Metaxopoulos. 1998. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *J. Appl Microbiol.* 84: 649-660
37. Stewart, C.M., M.B. Cole, and D.W. Schaffner. 2003. Managing the risk of Staphylococcal food poisoning from cream-filled baked goods to meet a food safety objective. *J. Food Prot.* 66: 1310-1325.
38. te Giffel, M.C., and M.H. Zwietering. 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 135-149.
39. Todd, E.W. 2004. Microbiological safety standard and public health goals to reduce foodborne disease. *Meat Sci.* 66: 33-34.
40. Tompkin, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment. *J. Food Prot.* 65: 709-725.
41. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, and Centers for Disease Control and Prevention. 2003. Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. Available at: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>. Accessed 2 April 2005.
42. Vose, D. 2000. Risk Analysis: A Quantitative Guide. John Wiley & Sons, Inc, New York, NY. pp 326.
43. Wijtzes, T., P.J. McClure, M.H. Zwietering, and T.A. Roberts. 1993. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *Int. J. Food. Microbiol.* 18: 139-146.
44. Zwietering, M. 2004. Practical considerations of food safety objectives. 2005. *Food Control* 16: 817-823.

4. Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano en alimentos (ECRM) y aplicación de métodos de Análisis de Sensibilidad

Con este trabajo se pretende profundizar en la metodología de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM). Para ello, se aplicó un modelo de ECRM que proporcionó predicciones del número de casos de listeriosis por año en personas ancianas de los Estados Unidos de América debido al consumo de productos cárnicos cocidos contaminados por *Listeria monocytogenes*. El modelo comprendió las fases que transcurren desde la venta del producto hasta su consumo doméstico. Además, como particularidad, no se consideraron fenómenos de contaminación cruzada, ya que se asumió que ocurrieron fuera del alcance del modelo; esto es, durante manufactura del producto o durante su venta, pero no posteriormente.

Por otra parte, el estudio incidió en la propuesta y aplicación de métodos de análisis de sensibilidad (Cullen and Frey, 1999) y su desarrollo gráfico. Estos métodos son la base para la construcción fundamentada de estrategias de reducción del riesgo, puesto que a través de ellos los principales factores de riesgo pueden ser identificados y cuantificados. Además, se evaluaron diferentes metodologías de modelado y su efecto sobre la estimación final.

El trabajo siguió el esquema propuesto por la FAO/WHO (1999) para la ERM estructurada en cuatro fases, si bien, la identificación del peligro no fue necesaria dadas las evidencias de la existencia del peligro.

El modelo de segundo orden (separando variabilidad e incertidumbre) construido en Excel y simulado a través del Software @Risk de Palisade© ayudó a interpretar más adecuadamente los resultados, y por tanto, a establecer medidas de control más eficaces.

El análisis de sensibilidad puso de manifiesto que los valores extremos de la distribución de dosis (log ufc/ración al consumo) fueron los responsables de la mayoría de casos de listeriosis. Por otro lado, para el caso de la variable “concentración en el punto de venta” se demostró que valores por debajo del límite de detección 0,04 cfu/g y el criterio 100 ufc/g produjeron el 29 y el 82 % de los casos de listeriosis, respectivamente. La explicación para estos resultados radica en el hecho de que niveles bajos fueron los más frecuentes en el punto de venta, y que estos pudieron incrementarse hasta niveles de riesgo durante la refrigeración doméstica sin necesidad de que las temperaturas y tiempos fueran especialmente extremos o abusivos. Finalmente, el análisis de sensibilidad aplicado sobre los parámetros de incertidumbre indicó que la prevalencia de *L. monocytogenes* en el punto de venta fue la fuente de incertidumbre más relevante para el modelo.

Esta información puede ser de relevancia en el establecimiento de estándares microbiológicos y políticas de reducción del riesgo más efectivas.

Otro aspecto de interés que surgió del presente estudio es la importancia de la densidad máxima de población (DMP), esto es, la población bacteriana máxima asumida a una temperatura determinada, en el riesgo producido por microorganismos patógenos oportunistas como *L. monocytogenes*. Así, según los resultados, sólo valores cercanos o correspondientes a la DMP fueron responsables de casos de listeriosis.

El presente capítulo ha originado la siguiente publicación:

Extracting risk managers-information from a Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in deli meats

Pérez-Rodríguez¹ F., E. D. van Asselt², R. M. García-Gimeno¹, G. Zurera¹, and M. H. Zwietering²

¹Department of Food Science and Technology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, C-1, 14014 Córdoba, Spain

²Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University, P.O. Box 8129, 6700 EV Wageningen, The Netherlands

Journal of Food Protection, en prensa

Extracting Additional Risk Managers-information from a Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in deli meats

4.1. Abstract

The risk assessment study for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods conducted by the U.S. Food and Drug Administration is an example of an extensive quantitative microbiological risk assessment that could be used by risk analysts and other scientists to obtain information and by managers and stakeholders to make decisions on food safety management. The present study was conducted to investigate how detailed sensitivity analysis can be used by assessors to extract more information on risk factors and how results can be communicated to managers and stakeholders in an understandable way. The extended sensitivity analysis revealed that the extremes of the right side of the doses distribution (at consumption, 9 to 11.5 log CFU/serving) were responsible for most of the cases of listeriosis simulated. For concentration, values below the detection limit of 0.04 CFU/g, and the often used limit for *L. monocytogenes* of 100 CFU/g (also at retail) were associated with a high number of annual cases of listeriosis (about 29% and 82%, respectively). This association can be explained by growth of *L. monocytogenes* at both average and extreme values of temperature and time, indicating that a wide distribution can lead to high risk levels. Another finding is the importance of the maximal population density (i.e., the maximum concentration of *L. monocytogenes* assumed at a certain temperature) for accurately estimating the risk of infection by opportunistic pathogens such as *L. monocytogenes*. According to the obtained results, mainly concentrations corresponding to the highest MPD-levels caused risk in the simulation. However, sensitivity analysis applied to the uncertainty parameters revealed that prevalence at retail was the most important source of uncertainty in the model.

4.2. Introduction

Food Safety is a relevant issue for international organizations, governments and companies. The General Agreement on Tariffs and Trade and Sanitary and Phytosanitary agreement propose risk assessment as the framework providing the scientific basis for ensuring fair commerce avoiding commercial barriers and guaranteeing consumer health (8). Quantitative Microbiological Risk Assessment (QMRA) is considered to be a useful tool for countries setting laws and standards for food safety policies and for industries trying to produce safer food products (5).

QMRA is an emerging scientific field, and some guidelines have been developed by international and national organizations (e.g., the Food and Agriculture Organization, World Health Organization, Scientific Committee for Foods, and the European Union). Nevertheless, there may be different approaches to modeling. In essence, the modeling process can be deterministic or probabilistic. In the first approach, point-estimate values are used to describe variables of the model (13). In the second approach, variables are distributions of probability, which can include

uncertainty and/or variability. Both approaches provide support for decision-making processes (risk management), although by including variability and uncertainty, insight into the level of accuracy is gained.

The interaction among the phases of risk analysis (risk Assessment, risk management and risk communication) is vitally when developing an effective policy for food safety in international, national, and industrial framework. The process includes weighing policy alternatives, considering risk assessment and other factors relevant to health protection of consumers and promotion of fair trade practices, and if needed selecting appropriate prevention and control measures. Communication of results of a risk assessment to managers, stakeholders, and others becomes very important because decisions of policy and laws depend on the comprehensibility of these results. The assessor should determine the variables of the model, identifying those variables and parameters that could lead to risk, and should then to explain them to the manager in a comprehensible way. However, in many cases risk assessors are focused on the modeling process and neglect the fact that the information generated in the risk assessment may be used by risk managers not familiarized with quantitative modeling and probabilistic methods. In other cases, risk assessments are performed to obtain an output (risk) without conducting detailed analysis of how factors are affecting risk. In both cases, we propose an extended sensitivity analysis which indirectly allows simplification or summarization of the risk assessment results to the most important aspects affecting risk, making communication to managers and stakeholders easier.

The aims of this study were i) to illustrate how valuable information for risk managers can be extracted from an extensive QMRA by applying sensitivity analysis, offering response and guidance in the decision-making processes and ii) to evaluate the impact of different modeling approaches on risk estimation. We reproduced the risk assessment by conducted by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for deli meat and elderly persons (21) because this food category and population group were estimated to be associated with the highest number of cases of *Listeria monocytogenes* infection.

4.3. Material and Methods

4.3.1. Scope of the model

To achieve the objectives of this work, an extensive two-dimensional risk assessment model was reproduced in an Excel (Microsoft, Redmond, Wash.) spreadsheet. The *L. monocytogenes* risk assessment in ready-to-eat foods (21) was selected for analysis because of the large amount of easily traceable information available. This risk assessment provides analyses and models that estimate the potential level of exposure of three population groups in the United States to 23 categories of food that could be contaminated with *L. monocytogenes* and relates this exposure to public health consequences. The model provides prediction of the likelihood that severe illness or death will result from consuming foods contaminated with this pathogen. The scope of the model goes from the retail point to the consumption phase (Fig. 1). Lag time and cross-contamination were not considered

because we assumed that these factors were not important after retail sale, so few variables were included in the model. Yang et al (23) reported that cross-contamination was irrelevant compared with possible growth after retail sale, which also supports the noninclusion of cross-contamination in the model. Only a small part of the model was used in our study, corresponding to the deli-meat category and elderly subpopulation, which were associated with the highest number of cases of listeriosis.

4.3.2. Exposure Assessment

A model of exposure assessment was developed using distributions of probability for the variables described in Figure 1.

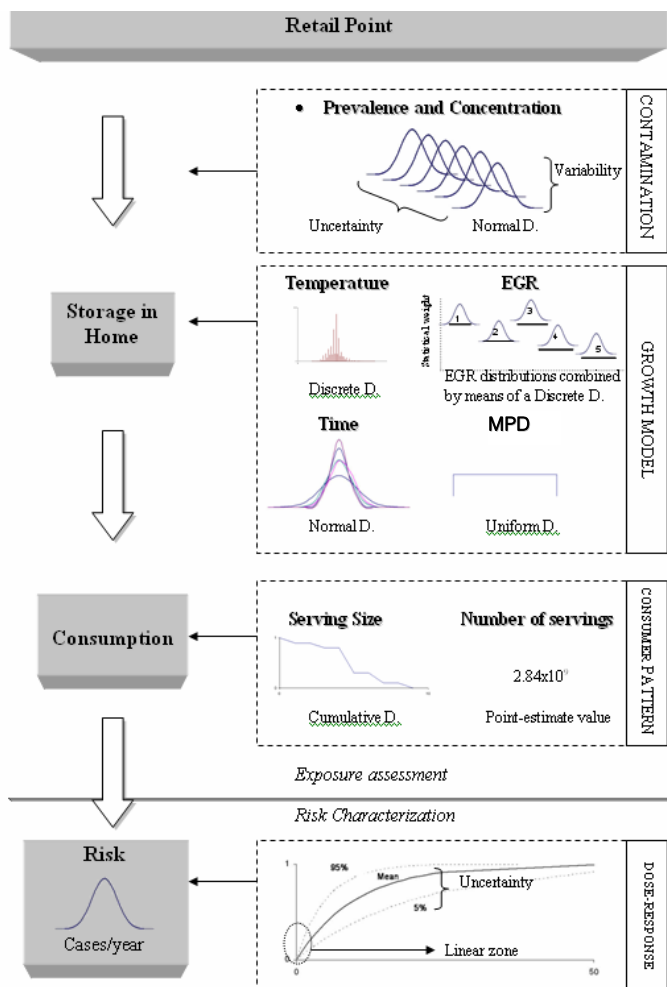


Figure 1. Schematic representation of the two-dimensional risk assessment of Listeria monocytogenes contamination in deli meat. EGR, exponential growth rate; MPD, maximal population density; D, distribution.

4.3.3. Exposure Assessment: prevalence and concentration at retail sale

A log normal distribution can be described through two parameters, μ and σ , but it is also possible to use only one of these parameters (μ or σ) and a percentile value. This property of the log normal distribution was used in FDA study (21) to combine both absence-presence and concentration data and to derive the concentration distribution for *L. monocytogenes* at retail. First, the frequency of positive samples was obtained from each presence-absence study. The concentration level for positive samples was assumed to be the detection limit of each study (e.g., 0.04 CFU/g for a method using 25 g-sample). These concentration and frequency define a percentile in the hypothetical log normal distribution derived from each presence-absence study. Second, the concentration from enumeration studies were used to estimate the standard deviation (σ) of the concentration of *L. monocytogenes* in the samples. Then, the parameter μ and percentile obtained from many presence-absence and enumeration studies were used and combined randomly to describe a set of 300 cumulative log normal distributions. Each log normal distribution represented the variability of the concentration of *L. monocytogenes* at retail, and the set of 300 log normal distributions represented the uncertainty about the log normal distribution. By applying the Excel Goal Seek procedure, the mean (μ) corresponding to each combination of σ /percentile was calculated. The set of 300 log normal distributions defined by μ and σ were used to simulate the variability and uncertainty of *L. monocytogenes* concentration at retail in the FDA model (21). The distributions were truncated on the right side at 9 log CFU/g to eliminate concentrations that are virtually impossible in food products (Table 1).

The use of a single distribution to account for prevalence and concentration could pose difficulties. In the concentration distribution, very low values are related to prevalence and concentration. For instance, a concentration of -5 log CFU/g, assuming a serving size of 100 g, means that there is a 1:1000 probability of exact one organism in a serving. The consequence of these difficulties is illustrated in a numerical example. If the growth of *L. monocytogenes* during domestic storage is modeled using the following equation describing growth:

$$\log(N_t) = \log(N_o) + EGR \cdot t \quad (1)$$

where $\log(N_t)$ is the final concentration (log CFU/g), $\log(N_o)$ is the initial concentration, EGR is the exponential growth rate (log CFU/day) at 10°C and t is storage time (days), and values are point-estimate, such as $EGR = 0.93$; $t = 12$ and $\log(N_o) = -5$, the final concentration is:

$$\log(N_t) = -5 + 0.93 \times 12 = 6.16 \text{ log CFU/g,}$$

which is not correct because in this calculation the probability 1:1,000 was treated as concentration when it is actually prevalence. However, when concentration and prevalence are separated, equation 1 would yield a final concentration of $-2 + 0.93 \times 12 = 9.16$ log CFU/g, in which the value -2 refers only to concentration (one

organism in a serving). It is obvious that these two different results reflect different levels of risk. However, risk also depends on factors such as growth limit and dose-response model (extrapolation in the linear and non-linear zone).

To overcome this problem, a conditional equation was applied to concentration distribution at retail. This equation filtered only those concentration values resulting in ≥ 0.5 cells per serving, assuming 0.5 to 1 cells per serving to be 1 cell per serving which is plausible from a probabilistic sense (21).

As an alternative to the above modeling approach, the use of separate distributions instead of a single distribution was studied for concentration and prevalence at retail. Because *L. monocytogenes* is supposed to be homogeneously distributed in deli-meat products (Poisson process), normal and exponential distributions could be used to describe both parameters separately (1). The normal distribution describing concentration only was defined using the original normal distribution (log) avoiding values of < 1 CFU per serving (< 0 log CFU per serving) by truncation. The probability of finding one cell or more per serving (i.e., prevalence) was described with an exponential distribution $p(x \geq 1) = 1 - \exp(-C \cdot S)$, where C is the concentration (CFU per gram) and S the serving size (grams) from the original normal distribution (1, 11). In principle, this approach seems to be more appropriate and accurate because concentrations of < 1 CFU per serving are translated into probabilities by the exponential distribution. For instance, if $C = 0.01$ CFU/g and $S = 80$ g are given in the simulation for a serving, we would have a probability of 0.55 of the serving being contaminated according to the exponential distribution. This means that if this value is present in the simulation 100 times, 55 occasions would have ≥ 1 CFU per serving (presence) and the remaining 45 would have 0 CFU per serving (absence). In turn, the single distribution (baseline model) has the advantage of being easier to use. Both approaches were compared on the basis of the results obtained to determine which modeling approach was the most appropriate.

4.3.4. Exposure Assessment: refrigerator temperature and storage time

Storage temperature (T) was described by means of a discrete distribution based on the 939 data points obtained from a survey of Audits International (9) (Table 1), reproducing thus the modeling procedure carried out in the FDA risk assessment (21). Use of discrete distributions has a drawback: only values defined in the distribution can be sampled in lieu of values in a continuous range; however looking at the high number of values used in the study, the negative effects were supposed to be minimal.

Storage time (t) was accounted for by a normal distribution of log days (Table 1). The parameters defining the normal distribution (the mean and standard deviation) also were distributions, so the mean was described by an empirical cumulative distribution representing the average time in the refrigerator (interhouse variation), and the standard deviation (intra-house variation) was described by a uniform distribution representing uncertainty in this parameter (see Table III-6 and Fig. III-7 of the FDA study (21)).

Table 1. Statistical distributions and point-estimate used to describe the variables of the model.

Input	Distribution
Variability and uncertainty of concentration of <i>Listeria monocytogenes</i> at retail (log CFU/g)	[Normal (μ , σ) ₁ , Normal (μ , σ) ₂ ... Normal (μ , σ) ₃₀] ^a ; truncate (. 9)
Variability of storage temperature (°C)	Discrete uniform ({-6, -3...21})
Variability and uncertainty of storage time (log days)	Normal (Log [Cumulative (0, 45, {0, 2, 5.5, 9, 12.5, 18, 26, 45}],{0, 0.39, 0.84, 0.91, 0.96, 0.97, 0.99, 1}], Uniform{0.4,0.6}) ^b
Variability of maximal population density (MPD) (log CFU/g)	Uniform (MPD-0.5, MPD+0.5)
Variability of serving size (g)	Cumulative (0, 648, {0, 11.2...648}), {0, 0.01,..1}) Triangular (-0.0113, 0.0785, 0.755007) = A
Uncertainty and variability of exponential growth rate (EGR) at 5°C (log CFU/day)	Weibull (1.45, 0.314009) = B Gamma (1.82, 0.160235) = C Beta (1.232895, 3.038674) = D Discrete {(A, B, C, D); (0.42 ,0.24, 0.2, 0.14)} ^c
Uncertainty of parameter <i>r</i> : scope of linear dose-response model	Pert (5•10 ⁻¹⁵ , 1•10 ⁻¹⁹ , 3•10 ⁻¹⁴) ^d

^a Thirty normal distributions described by the mean (μ) and standard deviation (σ) were selected randomly from a set of 300 curves accounting for the uncertainty around the concentration of *Listeria monocytogenes* at retail

^b Uniform distribution used to represent the uncertainty associated with the parameter σ (standard deviation) of the normal distribution describing storage time.

^c Discrete distribution refers to the uncertainty associated with the type of distribution (A, B, C and D). The probability assigned to each distribution was based on the goodness of fit to data

^d Pert distribution described by the parameters "most probable value", 5th and 95th percentile, respectively.

Spoilage flora can determine consumer behaviour because of changes in the organoleptic characteristics of the product. Because elevated storage temperature necessitates shorter storage time, a negative correlation coefficient (-0.25) was applied in the simulation to avoid unrealistic combinations of time and temperature. The coefficient choice was based on the information provided in the FDA study (21): when the refrigeration temperature was 10°C, the mode of the storage distribution was 5 days, and when the refrigeration temperature was 0°C the model of storage distribution was 7 days. The maximum storage time ranged from 20 to 30 days for storage at 10°C and 0°C, respectively.

4.3.5. Exposure Assessment: serving size

The serving size was modeled through an empirical cumulative distribution, whose mean was 59 g per serving and the extreme value on the right side was 648 g per serving (21), although this case presented a very low probability (Table 1).

4.3.6. Exposure Assessment: variability and uncertainty of exponential growth rate (EGR)

The square root model for EGR (equation 2) is used as a basis for calculating pathogen growth during storage (21).

$$\sqrt{\text{EGR}} = a \cdot (T - T_0) \quad (2)$$

where T is the growth temperature ($^{\circ}\text{C}$), T_0 is the extrapolated minimum notational growth temperature ($^{\circ}\text{C}$) whose value was -1.18°C , and a is the slope parameter for *L. monocytogenes* in the specific food.

To represent the variability and uncertainty of EGR, EGR at 5°C was taken from various studies (Appendix 6 of the FDA risk assessment (21)) and different distribution functions were built using @Risk Software according to the indications of the FDA study. To reflect the uncertainty in this parameter, it was used with a discrete distribution combining such distributions, where each distribution had a different statistical weight according to the goodness of fit (Table 1). Therefore, in each uncertainty realization a single EGR distribution was sampled from discrete distribution. Equation 3, which was derived from equation 2, was applied in the simulation to calculate EGR at the simulated temperatures, using the uncertainty and variability range of EGR_5 :

$$\text{EGR} = \text{EGR}_5 \left[\frac{T + 1.18}{6.18} \right]^2 \quad (3)$$

where EGR is the growth rate at the simulated temperature, EGR_5 is the growth rate at 5°C (Table 1), and T is the temperature simulated (Table 1).

T = Temperature simulated (Table1)

4.3.7. Exposure Assessment: maximal population density

Maximal population density (MPD) refers to the maximal concentration that a certain microorganism is able to reach under different conditions in a food matrix. This element is introduced into the model by a logical equation that prevents reaching a higher concentration than the MPD during the simulation (21).

The model assumes that the MPD depends on only storage temperature. Thus, when the temperature is less than 5°C , the maximal concentration is 5 log CFU/g. If the temperature is higher than 7°C , the concentration will not be above 8 log CFU/g during simulation. If the temperature ranges between 5 and 7, the concentration will be 6.5. To represent uncertainty in the FDA model (21), these limits are given a uniform distribution in a range of 1 logarithmic unit (Table 1), so the MPD above 7°C

could be given a limit within the range 7.5-8.5 log CFU/g. However, unlike the FDA study, the present work dealt with this MPD distribution as variability and uncertainty jointly. It is reasonable that the variation described by the distribution is also derived from factors such as biological variability, food matrix, and microflora effect, and not only from uncertainty in the MPD.

MPD is applied only for domestic storage because of the lack of data about temperatures in earlier steps of the food chain. If the initial pathogen concentration is already larger than the MPD, this initial concentration is used instead of the MPD to describe the concentration at consumption after domestic storage (no more growth)

4.3.8. Hazard characterization

In the hazard characterization step of FDA study (21), different types of adjustment factors were used to match the results of the model with the epidemiological data. In the FDA study, the initial dose-response relation from mice was transformed into a more suitable model for human beings.

The curves representing the average and 5th and 95th percentiles from a simulated set of 300 curves accounting for uncertainty (21) was chosen in the present study to build a simple dose-response relationship. Because the concentration of *L. monocytogenes* corresponded to the linear zone of the dose-response model, a straight line model was fitted to model dose-response ($r = 1 \times 10^{-19}$; 3×10^{-14} and 5×10^{-15}), corresponding to the 5th and 95th percentile and the mean, respectively). In the mean curve, for doses until 1×10^{12} , the deviation between this linear approximation and the exponential model developed in the FDA study (21) differed by less than 1%. These values were then used to define a Pert distribution accounting for the uncertainty of r being described through the parameters, most likely value, 5th and 95th percentiles (Table 1). This dose-response model represented initially the death probability, so a factor of 3.7, in accordance with the FDA study (21), was applied to obtain an illness curve (e.g., $r = 1.85 \times 10^{-14}$ for the mean curve).

4.3.8. Risk characterization

In this step, the dose-response relationship elaborated in the hazard characterization is linked with the results of the exposure assessment. However, prior to risk calculation, it is necessary to determine which definition of risk will be used. Because different stakeholders can use results from a risk assessment, it is important to identify the stakeholder to provide an understandable and suitable measure of risk.

The number of cases/serving (i.e., the probability of illness after consuming one serving of product) is a frequent manner of expressing risk; however, it will hardly support governmental policy and public intervention. This measure is relevant only for individual consumers on certain occasions, e.g., to determine the risk associated to consumption of one deli-meat product. For public administration (e.g., research institutes, or governments), concern is focused on public health of the overall population, and a logical definition of risk would be the number of cases per year and/or population. Because this work was conducted to analyze the risk of listeriosis

as an issue of public health, the most suitable definition of risk would be number of cases per year in a certain population. This risk could be calculated by applying a simple (equation 4) that integrates the information of both exposure assessment and hazard characterization to obtain a quantification of risk:

$$\text{RISK (cases/year)} = P C S r N \quad (4)$$

where P is the prevalence of *L. monocytogenes* at consumption (percentage), C is the concentration of *L. monocytogenes* at consumption (CFU per gram), S is the serving size (grams), r is the slope of the dose-response model (probability of becoming ill by ingestion of one cell of *L. monocytogenes*), and N is the number of servings consumed in a year. The product $C \times S$ is defined as the dose (D) at consumption, i.e., the number of cells consumed per serving (CFU per serving).

4.3.9. Estimating number of cases per year in a probabilistic framework

For the probabilistic model, some variables were simulated as probability distributions. To calculate the number of cases per year, equation 4 was applied in three steps.

1. Similar to the FDA study, the D distribution simulating the product $C \times S$ was divided into 23 half-log intervals (0-11.5 log CFU per serving) and each was multiplied algebraically by r value (constant for elderly population), obtaining 23 intervals of π_n (probability of becoming ill per contaminated serving in the dose range n).

2. Each π interval obtained was multiplied by the corresponding prevalent segment of servings, that is, the product of $P \times N \times f_n$, where f_n is the frequency (percentage) for each n interval of D distribution ($n = 1, \dots, 23$). Thus, the result was the number of cases of listeriosis per half-log interval of dose or π .

3. These 23 intervals were algebraically added to estimate the total number of cases per year:

$$\text{Annual cases} = \sum_{n=1}^{23} \pi_n P N f_n = \sum_{n=1}^{23} D_n r P N f_n = P N r \sum_{n=1}^{23} D_n f_n \quad (5)$$

This procedure was repeated for each uncertainty realization in the model.

4.3.10. Gaining insight of the inputs: which inputs are responsible for risk?

As mentioned in introduction, sensitivity analysis is proposed as a useful tool to determine the main risk-determining phenomena (19, 24) by identifying the most influential inputs and their zones or ranges in the model. Cullen and Frey (6) defined sensitivity analysis as the assessment of the impact of changes of inputs values on model output. Sensitivity analysis methods can be classified into mathematical, statistical, and graphical methods (10). Mathematical methods are based on the assessment of the effect of changes in the range of inputs on model output performed

in a deterministic way. The statistical methods use the stochastic character of variables (Monte Carlo and Latin hypercube techniques) so that the effect of the interaction among variables (inputs) can be taken into account. The graphical methods give visual indication of the influence of inputs on output (e.g., magnitude of impact and type of relation among variables). In addition, the graphical methods can be used to give a visual and comprehensive representation of sensitivity results from mathematical and statistical methods (22). A large number of sensitivity analysis methods have been published. For example, Frey and Patil (19) focused on 10 specific methods: nominal range sensitivity, break-even analysis, automatic differentiation technique, correlation and regression analysis, analysis of variance, response surface method, Fourier amplitude sensitivity test, mutual Information index, and scatter plots. The study by Patil and Frey (18) evaluated and identified the advantages and disadvantages of these methods in their application to QMRA and concluded that all methods could be validly applied to QMRA as long as the assumptions were met. In this sense, the study highlighted the fact that the combination and comparison between various sensitivity methods could help to provide more robust conclusions. However, in spite of the great variety of methods, only two are widely used in the studies of QMRA (2, 7, 17, 20): correlation analyses (statistical method) and scatter plots (graphical method).

Correlation analyses determine the contribution of the input to the output variability and thus are helpful for ranking the inputs but not for identifying how inputs (quantitatively) influences on output. Another disadvantage of this method is that its robustness largely depends on the type of model and the relationship among inputs and output (19). However, the scatter plots, which are graphical representation of inputs values versus the output can help to identify through visual analysis the type of relationship between input and output and even sometimes the presence of input threshold (value in an input range below which there is not response to changes in the output) (16) or zones of risk in inputs (22). For two-dimensional models, there is limited information on which methods are more useful for QMRA. For instance, Mokhtari and Frey (16) evaluated the analysis of variance and correlation analysis in a two-dimensional model and concluded that variance analysis gave more robust results. In the present work, the sensitivity analysis was based on iterations analysis, “what-if” scenarios analysis and graphical representation. These approaches provided an understandable and visual answer to the question of where risk comes from in the model and, as far as possible, avoided the complex statistical and mathematical aspects. Lindqvist et al. (14) used iterations analysis to extract detailed and quantitative information on the behaviour of variables (inputs) regarding risk. Carrington et al. (1) employed “what-if scenarios” analysis (truncating the input distribution at different values and using simulations) to find out which values of the inputs had a higher impact on final risk, thus identifying critical control points and critical limits (thresholds). The methods used here were performed in the following way taking into account the stochastic behaviour of variables (probabilistic analysis):

- The input studied is fixed to a certain value within the variable range, and the rest of the input distributions are allowed to vary during simulations (variability and uncertainty separately). The results from different simulations (output), each one at a different fixed value, were plotted into graphs. The graph shows

whether changes are constant or linear and whether results start to change more dramatically with increases in input value (threshold). This type of graphs is referred to here as sensitivity graph.

- A filtering method was applied to the distributions simulated to identify the zones of risk, i.e., ranges in input distributions that were associated with 95% of the cases. Simulated doses at consumption (EA output) were sorted out, and the amount of cases per dose range (RC output) were determined (Fig. 2). The highest dose ranges including 95% of cases were used as a criterion for tracing back and filtering out the iterations and values in the input variables that yielded such dose ranges at consumption (Fig. 2). The data filtered out were then plotted as a histogram and compared with non-filtered inputs (original distribution) using Microsoft Excel to identify risk-increasing conditions (Fig 2). This filtering method allowed us to identify which values and, in some cases, which zones of the inputs had a major impact on risk. This type of analysis was referred to here as iterations analysis.

4.3.11. Simulation of the model

The model was developed with two separate dimensions, variability and uncertainty (i.e., a two-dimensional model). Simulation was performed with 25,000 and 30 iterations for variability and uncertainty, respectively. This relatively small number of uncertainty iterations (also called realizations) was used for computational convenience; however through this number it is possible to obtain the most common statistics (mean and 5th, 50th and 95th percentiles). For instance, in the case of concentration at retail, the set of 300 log normal distributions was sampled up to 30 times by simple random sampling. The same procedure was carried out for other uncertainty parameters (temperature, EGR, and *r*-value). Throughout this work, the arithmetic mean or median and the 90% confidence interval (CI) were used to describe uncertainty in the model. Similarly, for variability the arithmetic mean or median and 5th and 95th percentiles were reported. The output for cases per year did not include variability, so the statistics used were referred exclusively to uncertainty; however, when statistics were used to describe variability, this use was indicated in the text to distinguish it from uncertainty statistics.

The simulation of the variability dimension was carried out by applying the Latin Hypercube technique implemented in @Risk Professional© software (Palisade, Newfield, N.Y.) to optimize the sampling in the extremes of the distributions. The uncertainty dimension simulation was performed by using a simple random sampling method implemented in Excel. In total, 750,000 data points were obtained and submitted to different analysis (sensitivity graphs and filtering methods).

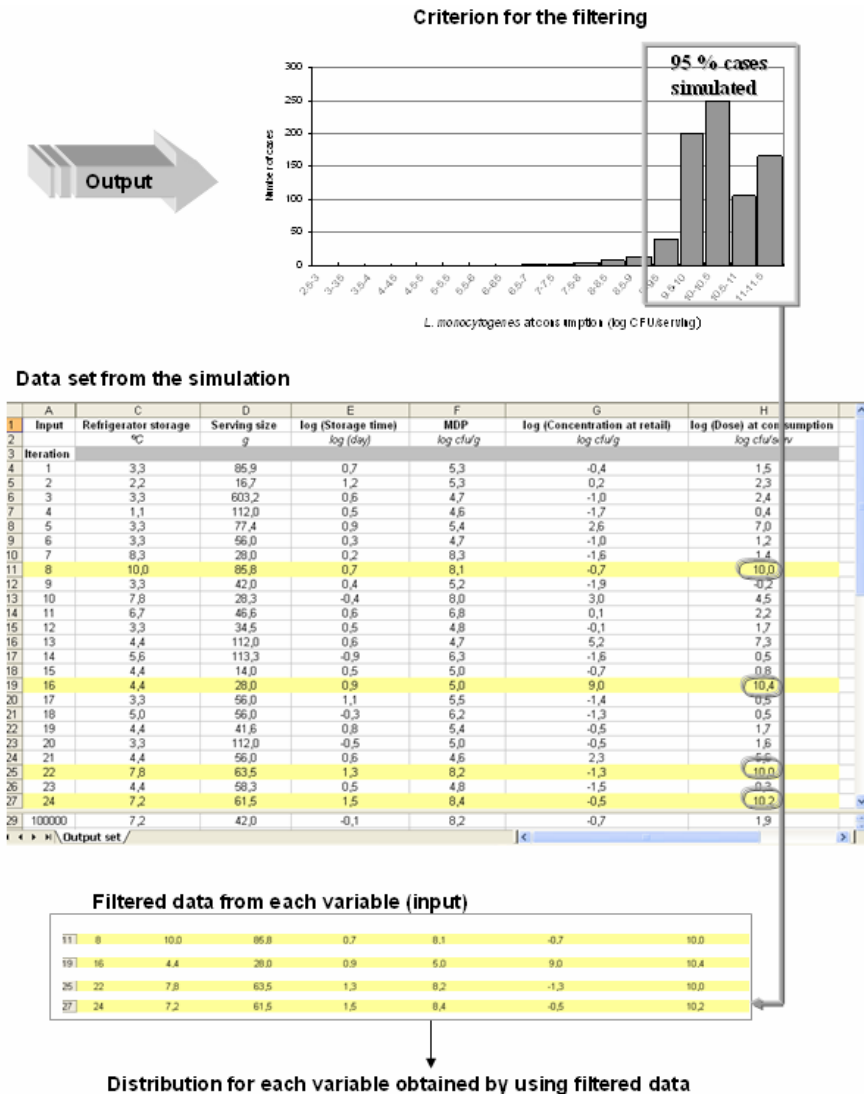


Figure 2. Filtering method applied to the inputs simulated to isolate those combinations of values that led to risk. The ranges of pathogen concentration at consumption (doses) accounting for 95 % of the listeriosi cases for different uncertainty realizations were used as criteria to filter the inputs. The filtered data were used to build frequency histograms that were compared with original distributions of the input.

To assess the variation associated with the sampling procedure used to simulate the model (17), 10 simulations (of 25,000 iterations each) were performed with different random number generator (RNG) seeds, which were chosen randomly. Effects of approximations between studies can then be judged in comparison to this variation. The coefficient of variation (CV) was used to quantify and represent such variation:

$$\%CV = \frac{100}{\mu} \cdot \frac{\sqrt{(x - \mu)^2}}{n} \quad (6)$$

where, x is the output of the two-dimensional model obtained (mean, median, or 5 and 95 % confidence intervals of cases per year predicted) at each value of RNG seed, μ is the mean of the data set x_1, x_2, \dots, x_{10} for the 10 RNG seed values, and n is the total number of data points ($n=10$).

The RNG-seed chosen for the baseline model was 10,000,000, because this number produced effective sampling in the extreme zones of the input distributions. Fixing the RNG seed value made it possible to compare between the results from different modeling approaches and simulated scenarios. The output obtained was used as a baseline result throughout the study.

4.4. Results and discussion

4.4.1. Output of the model

The CV was calculated according to equation 6 by using the results (cases per year) obtained with 10 different RNG seeds. The CV obtained for the mean cases per year was 31 %. The ample variation found was probably consequence of the important influence of RNG seed value on the sampling in the extreme right side of distribution, in which the highest values and the less probable values (e.g., of concentration or temperature) are situated. For median and 5th and 95th confidence percentiles (90 % CI), the CV was 64, 56, and 26 %, respectively. The variation in the mean number of cases per year seemed to be reasonable in accordance with the real variation in number of cases per year. For instance, Centers for Disease Control and Prevention (3) reported an average percentage change in the incidence of *L. monocytogenes* (annual cases per 100,000 population) of -21 % in the period 1996 to 2003. Thus, approximations in this model that give errors close to this 30% variation could be regarded as negligible. The main statistics of the simulated doses distribution (at consumption) and π are shown in Table 2. The simulation of the baseline model (with RNG seed equal to 10,000,000) resulted in 635 (90% CI: 22-1,739) cases per year, which is consistent with the results of the original model in the FDA study (767 cases in the elderly due to deli meats; Table A10-2 (21)) taking the uncertainty level reported earlier.

4.4.2. Risk is determined by the extreme doses at consumption

The impact on the risk of extreme doses at consumption is apparent when the half-log dose intervals are represented against the number of cases derived from each dose (Figure 3).

Table 2. Main statistics (variability and uncertainty) of simulated doses distribution (at consumption) and π (probability of illness per contaminated serving).

Output	Mean			Maximum			95 % Percentile		
	Mean	50%	90%CI -----	Mean	50%	90 % CI -----	Mean	50%	90 % CI -----
Dose (log CFU/serving)	-7.67	-7.43	-7.17-(-8.25)	10.81	10.93	10.65-10.93	-2.22	1.38	-7.91-1.80
π (cases/serving)	1.25•10 ⁻⁹	1.13•10 ⁻⁹	3.80 •10 ⁻¹⁰ -2.12 •10 ⁻⁹	9.73•10 ⁻⁶	1.22•10 ⁻⁵	6.39•10 ⁻⁶ - 1.23•10 ⁻⁵	3.57•10 ⁻¹⁵	3.49•10 ⁻¹⁵	1.76•10 ⁻²⁴ - 9.07•10 ⁻¹⁵
Cases/year	635	590	22-1739						

The analysis of variability and uncertainty iterations indicated that the most probable interval of doses at consumption (40 % of uncertainty realizations) responsible for 95 % of the cases per year was 9 to 11 log CFU per serving, which was also associated with the highest MPD, followed by 8.5 to 11 log CFU per serving with 33 % of uncertainty realizations and by 8 to 11 and 10 to 11 log CFU per serving with 23 % and 4 % of uncertainty realizations, respectively. These ranges indicate that a very small part of doses (at consumption), the interval 9 to 11 log CFU per serving, contained approximately a 0.1 % (median; 90 % CI, 0.01 to 0.13%) of servings simulated. Thus, the extreme right side of the dose distribution was responsible for the largest number of cases of listeriosis. The dose 95th percentile (1.80 log CFU per serving at 95 % of confidence level) (see Table 2), a statistic commonly reported in risk assessment studies, was not at all representative of the risk zone in doses distribution because of the very low prevalence of doses responsible for risk (9 to 11 log CFU per serving). This fact highlights the importance of performing sensitivity analysis to identify risk zones in distributions because this information can be used subsequently to select the most useful statistics or parameters to be reported to risk managers.

These findings were based on data similar to those obtained in the FDA study (21), in which a frequency (median) of 0.3 %, (90% CI, < 0.1 to 0.6 %) was reported for doses of > 9 log CFU per serving. Although a high frequency of doses is obtained for the range 3 to 6 log CFU per serving in both this and the FDA study, concentrations corresponded to > 9 log CFU per serving contributed most to listeriosis cases.

The strong relationship between the highest doses and the highest risk agrees with the conclusions of Hitchins (11), who reported that high doses are responsible for the observed listeriosis rates.

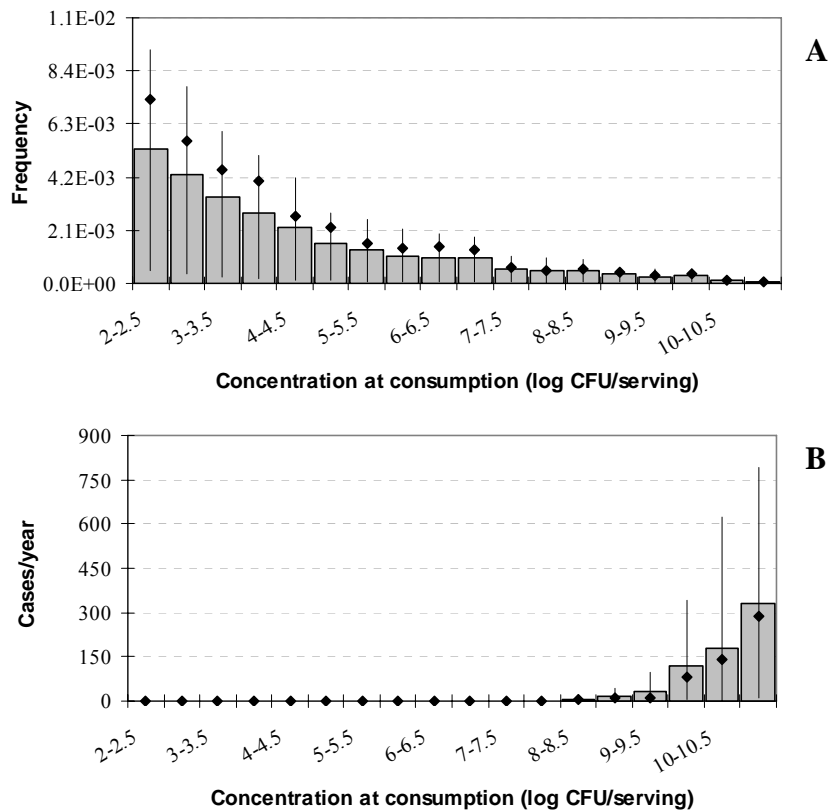


Figure 3. Frequency histogram representing (A) doses (at consumption) of *Listeria monocytogenes* (log CFU/serving) in the simulations and (B) number of cases of listeriosis per year at different dose of *L. monocytogenes* (log CFU/serving). Uncertainty bars represent median and 90 % confidence interval.

4.4.3. Concentration at retail

Sensitivity graphs in Figure 4A revealed that only values between 7 and 9 log CFU/g greatly increased risk. In contrast, the analysis of iterations plotted in Figure 5A and 5B (non-filtered and filtered data, respectively) revealed that the range between approximately -3 and 9 log CFU/g at retail was responsible for 95 % of listeriosis cases, which corresponds to the part of the distribution representing at least one *L. monocytogenes* cell per serving. This zone in the original distribution just represented 6% of concentrations found (90% CI, 0.8 to 11 %) (see Fig. 5A and 5B). The fact that the two sensitivity methods had different results is not especially contradictory because the sensitivity graph provides information exclusively on the effect of the magnitude of concentrations, whereas histograms of filtered data also take into account the statistical weight (frequency) of concentrations. Therefore, although extreme areas of the distribution of concentration at consumption led to major risk (as

shown in Figure 4A), it is also certain that risk can originate from a wide zone of the distribution of concentration at retail (Fig. 5B). The high frequencies in Figure 5B (servings responsible for 95 % of cases) for very low concentrations (-2 to 0 log CFU/g) indicated that the presence of only a single cell of *L. monocytogenes* at retail could lead to high levels of risk, which suggests that risk is dominated by the absence or presence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods but not for the concentration of *L. monocytogenes* because abundant growth is still possible.

An analysis of “what-if” scenarios for the servings accounting for 95 % of listeriosis cases provided more detailed information about the contribution of different contamination levels at retail to the overall risk:

When the concentration range of 6 to 9 log CFU/g was removed from (initial) concentration at retail, a reduction of cases of only 4 % (median = 2 % and 90% CI, 0.01 to 16 %) was obtained. The analysis of iterations (servings) corresponding to this range (6 to 9 log CFU/g at retail) confirmed that 95 % of servings did not undergo growth because they were already near, at, or above the MPD. Further, these concentrations only represented 0.01 % (90% CI, 0.001 to 0.03%) of the total servings at retail (original distribution). From a statistical point of view, this means that when 1,000 samples are analyzed there is only a 9.5 and 26 % probability of detecting at least one positive sample for the mean (0.01%) and 95 % confidence level (0.03%), respectively. Therefore, it seems that the detection of these concentrations is difficult and, may be ineffective: with low impact on public health but high impact on individual risk. The elimination of concentrations at retail in the range 2 to 6 log CFU/g resulted in a reduction of 17 % (90% CI, 0.01 to 34%) of listeriosis cases. This range comprised 0.4 % (90% CI, 0.01 to 0.05%) of the total servings at retail, a narrow part of original distribution.

With respect to the general *L. monocytogenes* limit of 2 log CFU/g in ready-to-eat foods, one could think that risk in the simulation would be mainly determined for values above this threshold. However, the analysis of filtered data (servings responsible for 95 % of the listeriosis cases) confirmed that 87 % (90 % CI, 63 to 100 %) of these servings were below this microbiological criterion at retail, which resulted in 82 % (90% CI, 40 to 98 %) of the cases. Thus, compliance with the microbiological criterion and/or performance objectives for *L. monocytogenes* in this step would not be completely effective for eliminating overall risk. The same applies for the criterion of 1 log CFU/g, with 79 % of servings (95 % of the cases) contaminated below this concentration. Furthermore, 33 % (90 % CI, 6 to 71 %) of the filtered data were below the detection limit (0.04 CFU/g) commonly considered in the presence-absence studies (25 g of sample analyzed). The percentage of servings contaminated at this concentration yielded a similar (relatively high) percentage of cases, i.e., 29 % (90% CI, 2 to 93%) of listeriosis cases. This finding implies that a significant number of cases could be caused by samples with nondetectable pathogen concentrations at retail. However, the wide uncertainty range for servings with 0.04 CFU/g indicated that at low concentrations uncertainty becomes a much more important factor. Thus, decisions and/or conclusions based on these results should be made carefully by considering the attendant uncertainty.

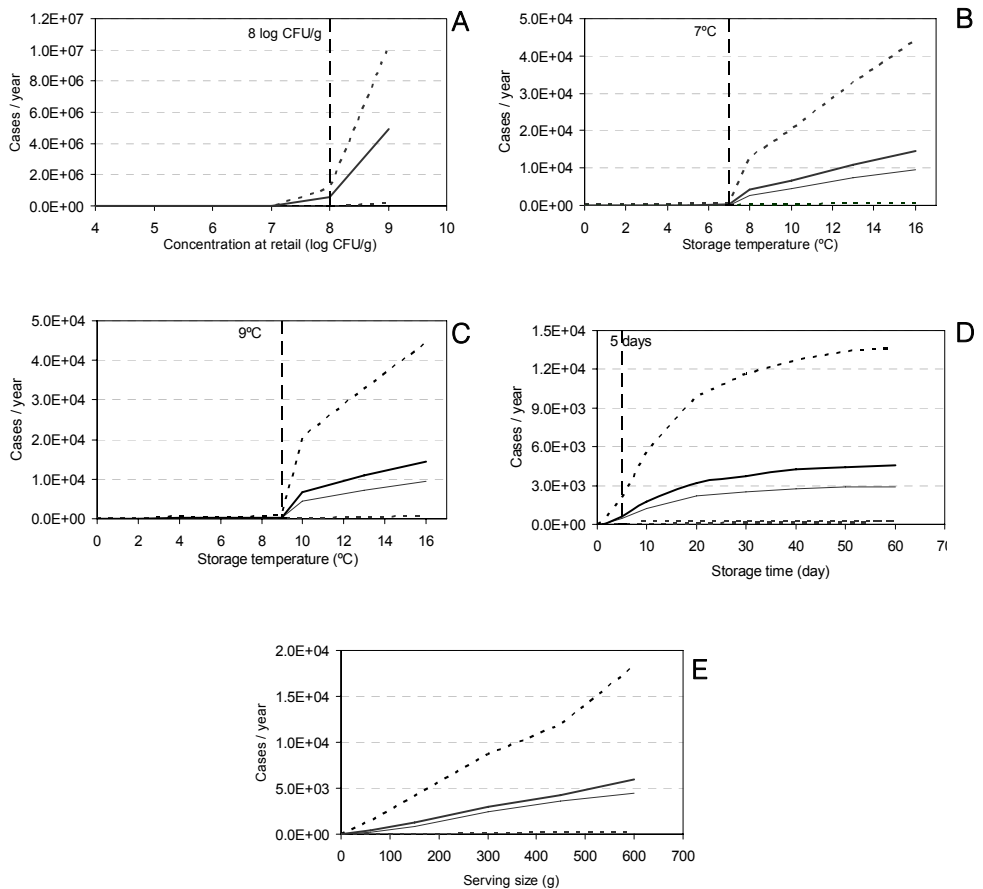


Figure 4. Graphical representation of the number of cases per year obtained at different concentrations at retail (A), different storage temperature using 7°C (baseline) as the temperature from which the highest maximum population density (MPD) of 8 logs can be reached (B), different storage temperatures when the temperature limit was changed from 7 (baseline) to 9°C (C), different storage time (D) and different serving size (E), which were fixed in each simulation. The rest of inputs were allowed to vary stochastically. Bold and smooth line represent mean and median, respectively. The dashed lines represent 90% confidence intervals (uncertainty). The vertical dashed lines indicate the input value yielding a sharp increase in the number of cases (threshold).

These findings are in accordance with those obtained in FDA study (21) and by Carrington et al. (1), who suggested that in foods that support growth, reduction of contamination to some specified level (but not zero) is not adequate by itself for controlling the risk of listeriosis. Nevertheless, Chen et al. (4) came to a different conclusion, which was summarized in the title “*Listeria monocytogenes*: Low Level Equal Low Risk”. This apparent discrepancy can be explained by the fact that these authors did not consider a growth step during domestic storage, and the risk of associated with ready-to-eat products was attributed mainly to relatively high concentrations of *L. monocytogenes* at retail sale. Thus, high risk can be associated

with low early concentrations because extensive growth can occur later, and high risk will be associated with high concentrations when later growth is not probable or possible. The implications of this conclusion could be relevant in decision-making process and in establishment of control measurements or mitigation strategies.

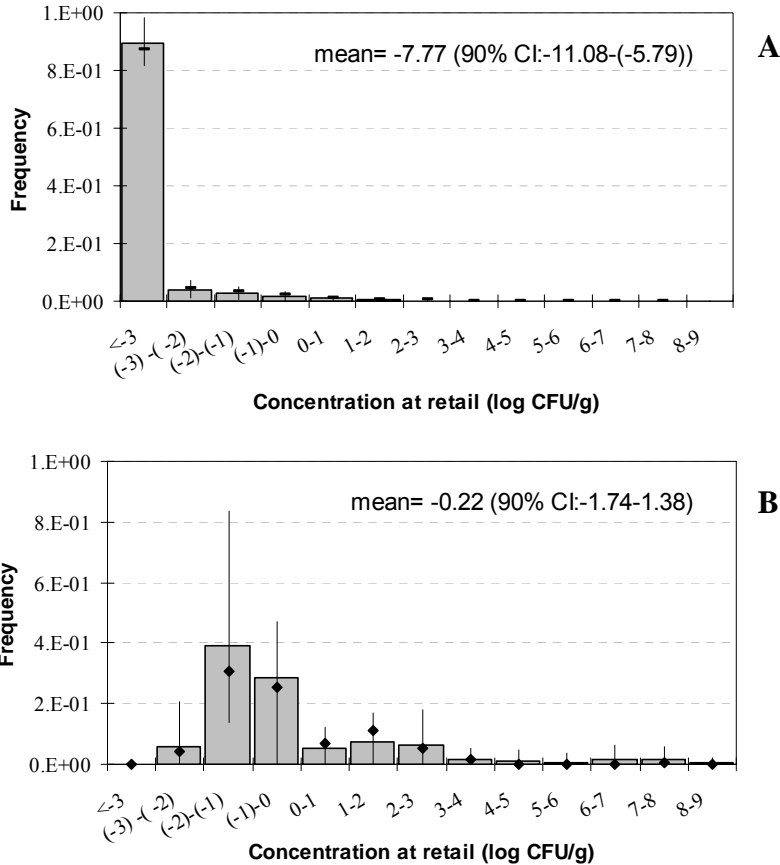


Figure 5. Frequency histogram of concentration of *Listeria monocytogenes* at retail, (A) Original distribution. (B) Accounting for 95 % of Listeriosis cases per year as simulated (filtered distributions). Uncertainty bars represent median and 90 % confidence interval.

4.4.4. Evaluating the effect of values $\ll 1$ CFU/g at retail on risk estimation

Use of a single distribution to describe concentration and prevalence obligates the use a conditional equation and avoiding the fact that very low concentrations can result in growth and thus falsely predict high concentrations in products that do not contain initial contamination. The method chosen in the simulations of the baseline model to prevent these false growth predictions was to remove those concentrations that gave values below 0.5 CFU per serving. However, this assumption could yield a certain bias in the results. Therefore, assuming that contamination of *L. monocytogenes* is a Poisson process, an exponential distribution could be used to describe the probability that one or more cells of *L. monocytogenes* can be found in a

serving (2). This alternative procedure resulted in a mean and median of 364 and 198 (90% CI, 15 to 1,102) cases, respectively, which means that the baseline model yielded an overestimation of 47 and 69 % for the mean and median, respectively and 45 and 39 % at 5 and 95 % confidence levels (90% CI), respectively. These values are slightly out of the uncertainty threshold obtained for the model; therefore, the difference found between both approaches was significant. The second approach produced a narrower CI, which means that the estimation from the baseline was less accurate, i.e., lent more uncertainty to the estimation. However, an overestimation of 2,845 (90% CI, 115 to 5,984) cases was obtained when data from the distribution of concentrations at retail were used without the above constraints, allowing growth in all products, even if initial concentrations are so low that on average there is less than one organism per serving. These findings indicate that in some cases the way this phenomenon is treated can have a significant impact on simulation outcomes. The use of a nonlinear dose-response model instead of a linear model (as used in the present study) would lead to greater difference between approaches. Therefore, an additional analysis should be carried out with an exposure assessment model to determine which modeling approach, separate distributions or a single distribution, will provide the most reliable estimation.

4.4.5. Refrigerator temperature and storage time

The iterations analysis of simulated storage temperature (Fig. 6A and 6B) revealed that the servings stored at 7 to 10 °C caused approximately 67 % (90% CI, 49 to 91 %) of the listeriosis cases, which represented only 14 % of the nonfiltered temperatures data or original distribution (Fig. 6A). The mean temperature for filtered data was 10.4 °C (90% CI, 6.9 to 12.6 °C), which was more than two times the mean of non-filtered data (4°C). These data indicate that most of cases could not be attributed to extreme temperatures abuse, although storage temperature below 7°C were associated with very few cases (mean: 2.7 %; 90% CI, 0 to 22 %). Similar conclusions can be reached from the sensitivity graph (Fig. 4 B), in which a threshold (dashed line) was situated around 7°C (which corresponds to the temperature limit used in the MPD model), from which an exponential increase in the number of cases were obtained. The findings here presented are in accordance with those reported in the FDA study (21) and by Carrington et al. (1). However, in the present work, these results were also confirmed when considering the uncertainty ranges.

The threshold was affected mostly by the temperature from which *L. monocytogenes* is able to grow up to the highest MPD. Thus, if in the model of MPD, the temperature limit is changed from 7 (baseline) to 9°C, the threshold rises from 7 to 9°C (dashed lines in Fig. 4 B and 4C).

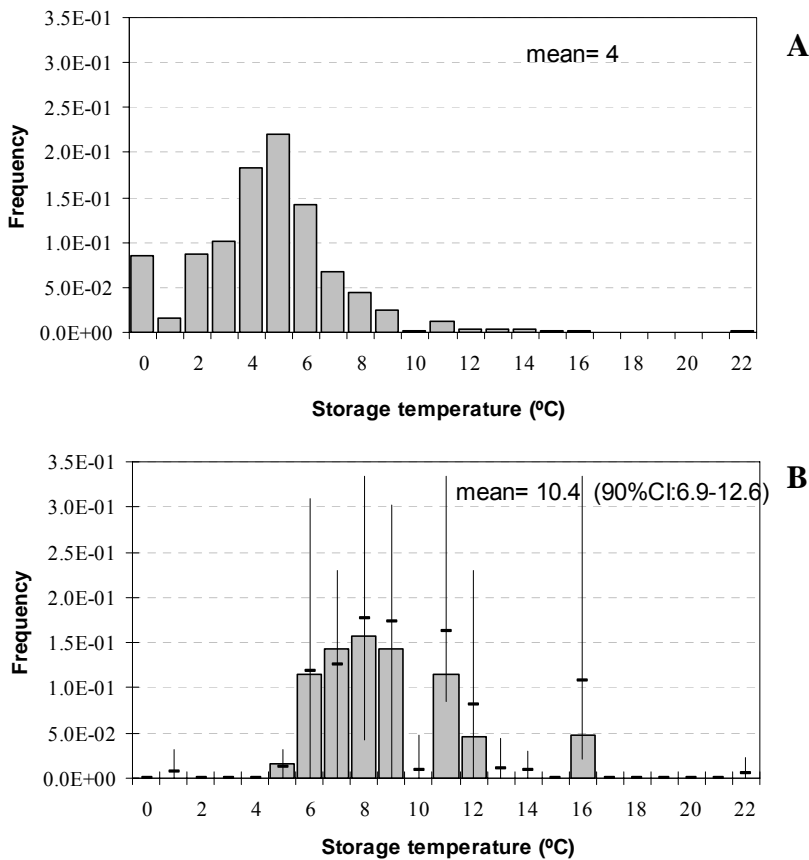


Figure 6. Frequency histogram of (A) storage temperature (original distribution) and (B) filtered storage temperatures accounting for 95 % of listeriosis cases per year as simulated (filtered distribution). Uncertainty bars represent median and 90 % confidence interval.

Storage time had a lesser impact on the number of listeriosis cases, as shown by the sensitivity graph in Figure 4 D, where there is no a clear threshold although a threshold could be situated at around 5 days. The filtered time values (responsible for 95 % of cases) ranged between 3.8 days (90% CI, 0.6 to 6.8 days) and 43 days (90% CI, 17 to 60 days), with 39 days (90% CI, 17 to 55 days) being the 95th percentile (see Fig. 7A and 7B). Almost any storage time could lead to risk because the domain of the filtered distribution and 95th percentile were quite similar to those in the original distribution, which corresponded to 0 to 60 days and 25 days (90% CI, 22 to 27 days) respectively (Fig. 7A and 7B). The mean of the filtered distribution corresponded to 19 days (90% CI, 16 to 22 days), i.e., three times the mean of the nonfiltered distribution (5.9 days, 90% CI, 5.5 to 6.3 days).

To clarify further the impact of the combination of storage temperature and time on number of listeriosis cases, *T-t* combinations (for 95 % of the cases) were analyzed. First, the *T-t* combinations were grouped according to the associated log-

increments (<1; 1 to 4; 4 to 7; >7 log CFU/g). Next, T - t combinations were transformed into T - t intervals (e.g., 4-8°C for 10 to 20 days) and frequencies were calculated for each interval combination. This analysis (Table 3) confirmed that extreme values of temperature and time together were not possible, i.e., when the temperature exceeded 9°C, only on rare occasions did storage time exceeded 20 days because of the negative correlation coefficient implemented in the model. Extreme values could be present in the simulation but only with relatively low values of the other variable (e.g., 21°C for 3 days).

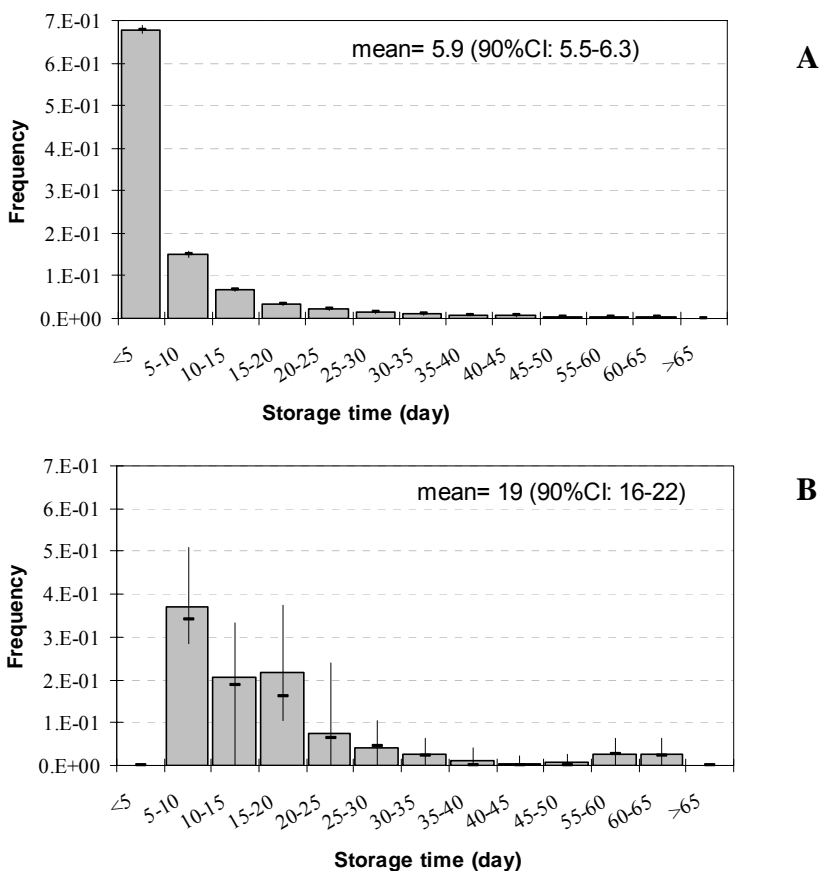


Figure 7. Frequency histogram of (A) storage time (original distribution) and (B) filtered storage times accounting for 95 % of listeriosis cases per year as simulated (filtered distribution). Uncertainty bars represent median and 90% confidence interval.

The lowest T - t combination (<4°C and <10 days) was found in lower categories, i.e., <1 and 1 to 4 log CFU/g, (see Table 3), which corresponded to servings with initial high concentrations (at retail, 7 to 8 log CFU/g) that could cause listeriosis after either slight or no growth during domestic storage.

The fact that the higher growth categories (4 to 7 and >7 log CFU/g) had higher frequencies for servings responsible for 95 % of listeriosis cases indicated that risk was derived further from an extensive growth (Table 3). This can be clearly seen for growth of > 7 log CFU/g, where servings responsible for 95 % of cases had a frequency of 77.4% (90% CI, 50.7 to 100%) in contrast with the low frequency found for this same range in the nonfiltered data (2.42%; 90% CI, 1.48 to 4.05%) (Table 3). Besides, these increases were associated with both low initial concentrations (predominant in the original distribution) and the highest MPD (data not shown).

The high frequency found for growths of 4 to 7 and >7 log CFU/g (Table 3) indicated that combinations of nonextreme temperatures and times (95% of cases) resulted in high levels of growth and consequently high risk. These values corresponded to the combinations 12 to 16°C for <10 days and 8 to 12°C <30 days. The first combination was more frequent than the second, although in this case most of the temperature values were situated close to 12°C.

These findings can be worked out if we take from the above intervals the minimal T (8°C) and average t (15 days) and apply equation 1: $EGR = 0.55 \log \text{CFU per day for the given temperature}$. This approach gave a theoretical increment of 8.3 log CFU/g, thus reaching risk levels (e.g., 9 to 11.5 CFU per serving). This extensive log increment could be seen, though less often, when the time was shorter and temperature were higher (abuse temperature) or when the time was longer and the temperature much lower (see Table 3). For example, 14°C for 8 days and 7°C for 47 days produced in the simulation an increment of >10 and >8 log CFU, respectively, leveling off to the MPD. Therefore, extreme values are possible but encountered less frequently.

4.4.6. Serving Size

The filtered data accounting for 95 % of listeriosis cases (Fig. 8A and 8B) produced a mean of 114 g (90% CI, 76 to 197 g), almost two times the mean of the nonfiltered data (59 g). The 95th percentile of the filtered data was 253 g (90% CI, 157 to 518 g), just about two times the value for non-filtered data (113 g). A visual comparison of both the nonfiltered and filtered distribution (Fig. 8A and 8B) revealed that a wide range of the original distribution could lead to risk, with the central zone the most important zone (around the mean).

Results from the sensitivity graph in Figure 4E revealed that the number of listeriosis cases is directly proportional to serving size. Thus, changes in serving size would translate equally into proportional changes in the number of cases (straight line), indicating that the effect is the same throughout the range of the variable. Conversely, the number of cases showed nonlinear relationships with the refrigerator temperature and storage time which means there are certain zones in the variable, which have a much higher impact on the number of cases. This inconsistency is a consequence of the mathematical relationship in which the variable is involved and its magnitude. Serving size increases the dose linearly, whereas time and temperature increases result in an exponential dose increase because of exponential growth. Both

sensitivity methods indicate that the impact of serving size on the risk (number of cases) is not comparable to those impacts of storage temperature and time.

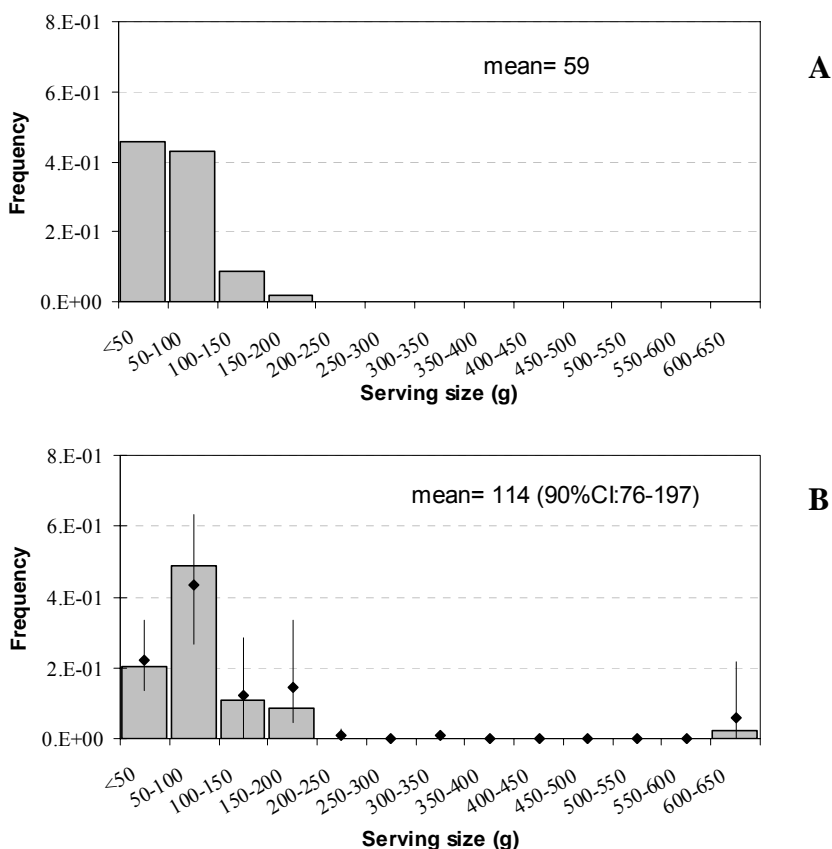


Figure 8. Frequency histogram of (A) serving size (original distribution) and (B) filtered serving sizes accounting for 95 % of cases per year as simulated (filtered distribution). Uncertainty bars represent median and 90% confidence interval.

4.4.6. Importance of Maximal Population Density in risk estimation

MPD is incorporated into the model to establish the limits of *L. monocytogenes* growth. The MDP is especially important for pathogens as *L. monocytogenes* because although low doses (10^2 to 10^4 CFU/g) have been associated with listeriosis outbreaks (15), only high doses (near the MPD) are likely to have the highest impact on total number of cases in a given population (Fig. 3A and 3B). Ninety-one percent (90% CI, 78 to 92%) of the servings responsible for 95 % of listeriosis cases reached the MPD during domestic storage. Hence, uncertainty and/or variability associated with this parameter could be considered a significant component in risk estimation. To evaluate the effect of the MPD in the estimation of risk, two different analyses were performed on the MPD variability.

1. The variability incorporated into the MPD model with a uniform distribution can be disputed because rarely does a physiologic parameter follow this type of distribution. Therefore, a normal distribution was introduced and evaluated in the model instead of uniform distribution. The values obtained were not very different from those in the baseline model: 8% fewer cases (90% CI, 0.1 to 4%), which is close to the expected variation in the number of cases. The degree of difference from baseline model also depended on the parameters values chosen for describing the normal distribution.

2. The variability range was extended to include higher values during the simulation. Such high MPDs have been reported in ComBase (<http://wyndmoor.arserrc.gov/combase>). An increase of 0.5 log units on the maximal growth yielded an estimated mean of 6,370 cases, 10 times the number of cases obtained with the baseline model (634). However, when the MPD was reduced 0.5 log, an inverse effect was observed. Nevertheless, the change was not quantitatively the same because the number of cases declined from 634 (baseline) to 254, which means a drop of 58% in the baseline model. This finding indicates that relatively small changes in the MPD can result in significant changes in the number of cases predicted.

The risk assessment study conducted by the Food and Agriculture Organization and the World Health Organization (FAO-WHO) on *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods (9) revealed (for the example of cold-smoked fish that supported growth) that the variation in the MPD (sensitivity analysis) had no effect on the estimation of the risk because growth never reached the MPD. The explanation for this discrepancy between findings of different studies is not the low frequency of the MPD, which both studies found, but the modeling method used. In FAO-WHO study, the MPD was taken from growth studies in broth, which produces higher population than do food matrices (as used in the FDA study and our study). In contrast, in the FAO-WHO study the impact of the spoilage flora on the growth of *L. monocytogenes* was included by applying a reduction rate to growth when the spoilage flora reached a high level (the effective MPD). Thus, the initial MPD implemented in the model was rarely reached because of these two facts. In the FAO-WHO report, the conclusion drawn from the sensitive analysis was that the effect of reduction of the growth of *L. monocytogenes* greatly influenced the risk estimation, proving indirectly that the limit of growth or MPD had an important effect on the risk estimation. For pasteurized milk, the same modeling method used in the present study was used in the FAO-WHO study, and the MPD was seldom reached as observed in our study. However, the doses associated with the MPD were responsible for most cases in the simulation (risk is determined by the extreme doses at consumption) because these doses greatly influence the the probability of becoming ill (see Fig. 3).

Table 3. Frequency intervals corresponding to different combinations of temperature and storage time associated with 95% of listeriosis cases (filtered data).

Storage temperature (°C)	Storage Time (day)	Mean frequency and 90% CI ^a of servings responsible for 95 % cases							
		> 7 log CFU/g		4-7 log CFU/g		1-4 log CFU/g		< 1 log CFU/g	
		7.74E-01 (2.42E-02) ^b	5.07E-01-1 (1.48E-02-4.05E-02) ^c	1.61E-01 (4.71E-02)	0-3.00E-01 (3.76E-02-5.50E-02)	2.98E-02 (1.83E-01)	0-8.35E-02 (1.63E-01-1.95E-01)	3.41E-02 (7.45E-01)	0-1.35E-01 (7.31E-02-7.71E-01)
<4	<10	-	-	-	-	5.29E-04	Not calculated	6.62E-03	2.95E-02-2.95E-02
	10-20	-	-	-	-	-	-	-	-
	20-30	1.11E-02	Not calculated	-	-	-	-	-	-
	50-60	-	-	-	-	-	-	9.80E-04	Not calculated
4-8	<10	7.59E-02	0-3.33E-01	8.10E-03	0-3.58E-02	6.44E-03	0-3.17E-02	4.67E-02	1.08E-01-1.08E-01
	10-20	9.67E-02	0-2.86E-01	4.76E-02	0-1.17E-01	1.12E-02	0-3.79E-02	1.76E-03	1.60E-02-1.60E-02
	20-30	8.16E-02	0-2.21E-01	1.09E-02	0-3.24E-02	4.63E-03	0-2.49E-02	-	-
	30-40	1.76E-02	0-4.89E-02	2.69E-03	0-2.61E-02	-	-	-	-
	40-50	3.07E-03	0-2.22E-02	2.08E-03	0-1.58E-02	-	-	-	-
	50-60	2.29E-02	0-5.14E-02	1.62E-02	0-3.62E-02	3.80E-03	0-1.63E-02	-	-
8-12	<10	1.16E-01	0-2.28E-01	2.78E-02	0-6.25E-02	2.33E-02	0-5.58E-02	-	-
	10-20	2.20E-01	6.11E-02-6.67E-01	1.88E-02	0-5.34E-02	-	-	-	-
	20-30	3.01E-02	0-1.08E-01	1.99E-03	0-1.92E-02	-	-	-	-
	30-40	1.27E-02	0-3.13E-02	1.79E-03	0-1.55E-02	-	-	-	-
	40-50	5.01E-03	0-2.49E-02	-	-	-	-	-	-
	50-60	1.11E-02	0-2.35E-02	-	-	-	-	-	-
12-16	<10	8.58E-02	0-3.33E-01	1.26E-02	0-3.07E-02	1.45E-03	Not calculated	-	-
16-22	<10	5.19E-03	0-2.49E-02	-	-	-	-	-	-

^a 90 % Confidence interval; ^b Mean frequency and 90 % CI for non-filtered data are reported between brackets; ^c 90 % CI for non-filtered data are reported between bracket

4.4.7. Effect of uncertainty on number of cases estimate

Uncertainty propagation through model depends on many factors such as number of inputs, model formulation, nonlinear and linear character (12). QMRAs are nonlinear models that normally lead to amplified uncertainty during simulation (6). This amplification also occurred in the present study when in sensitivity graphs the changes in the inputs produced large increases in the uncertainty ranges (CIs), especially for some values (threshold). Model structure and modeling types also had an important impact on uncertainty ranges, as demonstrated for the modeling of $\ll 1$ CFU/g and MPD.

The model presented here included uncertainty in four inputs: pathogen concentration at retail sale, storage time, EGR and r -value. In the previous sections of this report, we focused on the effect of inputs variability on the output (cases per year) considering also uncertainty ranges (the CIs) of the estimates.

To show how inputs uncertainty affected the output, 100 uncertainty realizations, each with 25,000 iterations of variability, were performed. The uncertainty values simulated were plotted against the estimated number of cases (in a scatter plot), and Pearson correlation coefficient was calculated. This coefficient may range from -1 to 1, where 1 indicates a positive linear dependence; 0 indicates no linear dependence; and -1 indicates a negative linear dependence (22). The Pearson correlation coefficient provided in this case information on how the uncertainty range of the inputs affected the variation of the output (uncertainty). The scatter plots (Fig. 9A) revealed that uncertainty range for the mean of concentration at retail clearly influenced the estimated number of cases, with the highest Pearson correlation (0.44). This result was expected because the mean of the log normal distribution (concentration at retail) is related to the prevalence, which was one of the most important factors affecting risk (cases per year). Also, uncertainty in r -value had certain influence (Fig. 9B), with a Pearson coefficient of 0.27. However, for storage time and EGR it was not found a clear trend or association (see Fig. 9C and 9D). For storage time, the Pearson coefficient was 0.02 which was consistent with the indications of the scatter plot. Conversely, for EGR the Pearson coefficient could not be calculated because of the qualitative character of the uncertainty plotted here (different distributions). Nevertheless, use of the triangular distribution, when sampled, resulted in a higher number of cases than did use of other distributions.

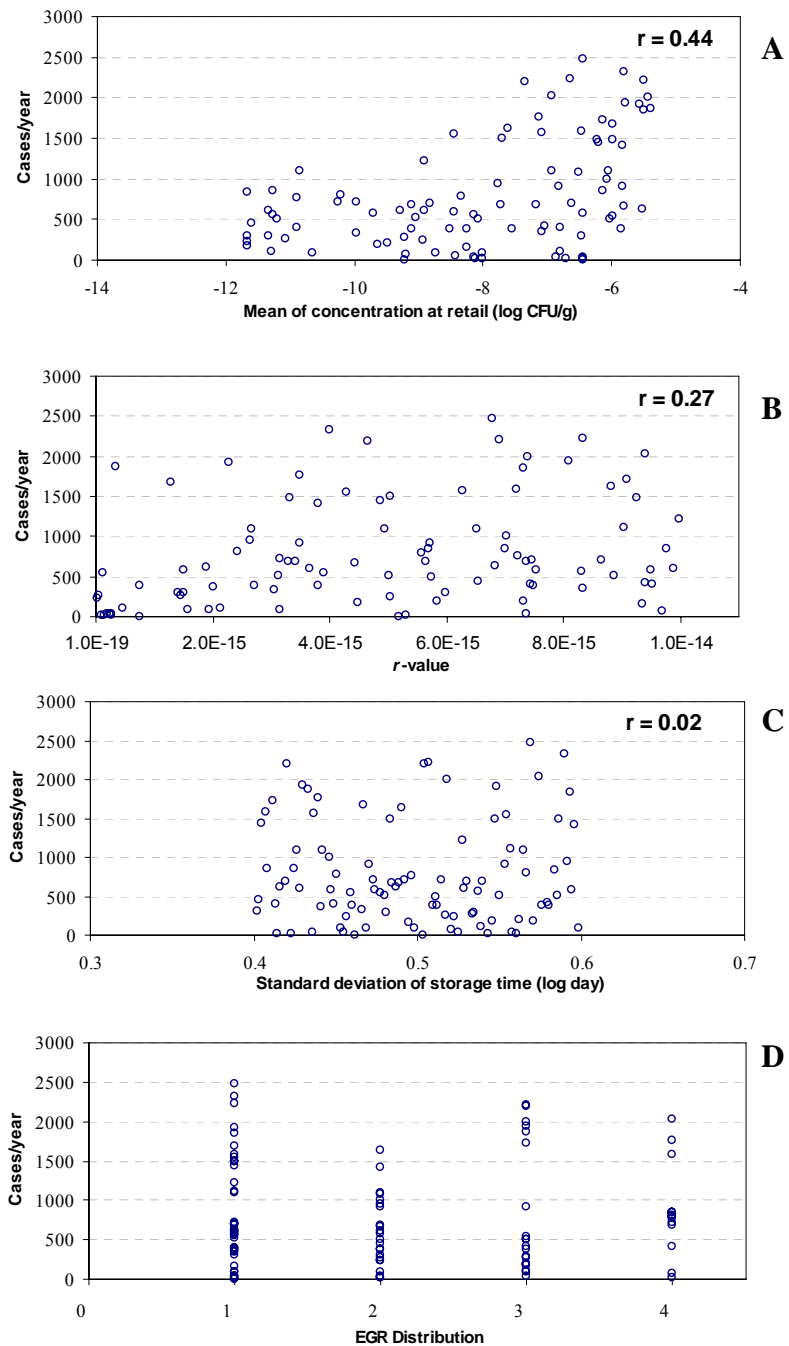


Figure 9. Scatter plot of uncertainty values versus number of listeriosi cases per year for (A) mean of the concentration at retail (log normal distribution) (B) the r -value (beta-Pert distribution), (C) the standard deviation of storage time (log normal distribution) and (D) the EGR (exponential growth rate) described by different distributions: triangular(1), Weibull (2), gamma (3) and beta (4).

4.5. Conclusions

Results indicated that a high percentage of listeriosis cases was derived from low concentrations at retail. Low concentrations ($< 2 \log$ CFU/g) grew up to risk levels (9 to 11.5 CFU per serving) even at nonextreme combinations of storage temperature and time. Thus, from a management standpoint, the absence criterion (e.g., in 25 g) may be recommended as a reasonable measure for foods supporting growth to significantly reduce the number of cases. In turn, for foods not supporting growth a concentration criterion (e.g., 100 CFU/g) seems to be more appropriate for controlling the high concentrations, which is the main cause of risk. Our analysis revealed that the recommendation of consistent refrigeration temperatures at home below a certain threshold (7°C in our analysis) could help lower risk levels (23). The effectiveness of this value is based on reduction of both EGR reduction and MPD. In this same sense, the MPD is an important factor in listeriosis incidence and, probably also in infections cause by other opportunistic pathogens. For a psychrotrophic microorganism such as *L. monocytogenes* this factor can be even more determinant than temperature-time combinations because of the ability of this microorganism to grow at a wide range of temperatures common in household refrigerators. An understanding of the factor that can affect the MPD (e.g., preservative formulation, temperatures, food matrix, and competitive flora) and the development of more accurate and comparable MPD models could lead to more effective risk management. The results obtained through sensitivity analysis indicate that the prevalence of *Listeria* at retail and the *r*-value were the most important sources of uncertainty in the model but modeling and model structure also influenced the inaccuracy of the risk estimate. Regarding uncertainty derived from prevalence, extensive absence-presence studies using more sensitive and precise microbiological methods could be helpful for obtaining a clearer estimate of real prevalence. Standardization of microbiological and sampling methods (e.g., through national and international joint programs) could yield to more accurate and comparable estimations of the parameter (among different studies), and consequently better QMRAs.

When complex and extensive risk assessments are carried out, much information can be obtained; however, it may be difficult for risk managers and stakeholders to use this information correctly because they may fail to understand the data. In the present study, an extensive analysis of the risk factors was performed and graphical representations were developed to make the data more understandable and to respond to questions from risk management. Results of this interactive process between assessors and managers can be improved if a two-way process is used, i.e., the responses given by risk assessors to questions from risk management yield new management questions. At the end of the process, clearer and more specific information would be available to decision makers. Application of extended sensitivity analysis techniques by risk assessors could lead to more specific information regarding risk management options and to identification of determinant zones within risk factors.

Acknowledgments

The authors thank Antonio Valero, Elena Carrasco, Rafael Ventura, Salman Roger and both reviewers for their help and valuable comments on earlier versions of this paper. This work was performed as a collaboration between Wageningen University and University of Córdoba and was partly financed by MCYT AGL2001-2435, AGL2005-119, and the Research Group AGR-170 HIBRO of the Plan Andaluz de Investigación (PAI).

4.6. References

1. Carrington, C.D., Dennis, S.B., Whiting, R.C, Buchanan, R.L. 2004. Putting a risk assessment model to work: *Listeria monocytogenes* "What-if" scenarios. *J. Assoc. of Foods Drugs Off.* 68:5-19
2. Cassin, M.H., M. Lammerding, E.C.D. Todd, W. Ross, and R. S. McColl. 1998. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int. J. Food Microbiol.* 41:21-44
3. Centers for Disease Control and Prevention. 2004. FoodNet 2003 surveillance report. Available at http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2003/2003_report.pdf. Accessed 25 February 2006.
4. Chen, Y., W. H. Ross, V. N. Scott, and D.E. Gombas. 2003. *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. *J. Food Prot.* 66:570-577.
5. Codex Alimentarius Commission. 1999. Principles and guidelines for the conduct of microbial risk assessment CAC/GL-30. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf . Accessed 25 February 2005.
6. Cullen, A.C. and Frey, H.C. 1999. Probabilistic techniques in exposure assessment. Plenum Press, New York.
7. Fazil, A.M., Ross, T., Paoli G., Vanderlinde, P., Desmarchelier P., Lammerding, A.M. 2002. A probabilistic analysis of *Clostridium perfringens* growth during food service operations. . *Int. J. Food Microbiol.* 73:315-329.
8. Food and Agriculture Organization and World Health Organization. 1995. Application of risk analysis to food standard issues. Report of the Joint FSO/WHO Expert Consultation. Geneva, Switzerland, 13-17 March 1995. World Health Organization, Geneva.
9. Food and Agriculture Organization and World Health Organization. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. Technical report. Available at: http://www.fao.org/es/ESN/jemra/listeria_en.stm. Accessed 15 January 2005.
10. Frey, H.C. and S.R. Patil. 2002. Identification and review of sensitivity analysis methods. *Risk Anal.* 22:553-579.
11. Hitchins, A.D. 1996. Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 30:71-85

12. Hoffman, F. O. and J.S. Hammonds. 1994. Propagation of uncertainty in risk assessments: the need to distinguish between uncertainty due to lack of knowledge and uncertainty due to variability. Conference proceedings: "When and How Can You Specify a Probability Distribution Function when You Don't Know Much?" *Risk Anal.* 14:707-712.
13. Lammerding, A.M. and A. Fazil. 2000. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 58:147-157
14. Lindqvist, R., S. Sylven, and I. Vagsholm. 2002. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 78:155-170.
15. McLauchlin, J., R.T. Mitchell, W.J. Smerdon, and K. Jewell. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92:15- 33.
16. Mokhtari, A. and H.C. Frey. 2005. Sensitivity analysis of a two-dimensional probabilistic risk assessment model using analysis of variance. *Risk Analysis* 26: 1511-1529.
17. Oscar, T.P. 2004. A quantitative risk assessment model for *Salmonella* and whole chickens. *Int. J. Food Microbiol.* 93:231-247.
18. Patil, S.R. and H.C. Frey. 2004. Comparison of sensitivity analysis methods based on applications to a food safety risk assessment model. *Risk Anal.* 24: 573-585.
19. Satelli, A. 2002. Sensitivity analysis for importance assessment *Risk Anal.* 22:579-588.
20. Strachan, N.J.C., G.M. Dunn, and I.D. Ogdén. 2002. Quantitative risk assessment of human infection from *Escherichia coli* O157 associated with recreational use of animal pasture. *Int. J. Food Microbiol.* 75:39-51.
21. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Centers for Disease Control and Prevention. 2003. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Available at: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lm2-toc.html>. Accessed 15 July 2005.
22. Vose, D. 2000. Risk Analysis: A Quantitative Guide. John Wiley & Sons, Inc, New York.
23. Yang H., A. Mokhtari, L. Jaykus, R.A. Morales, S.C. Cates, and P. Cowen. 2006. Consumer phase risk assessment for *Listeria monocytogenes* in deli meats. *Risk Anal.* 26:89-103.
24. Zwietering M.H and van Gerwen, S.J.C. 2000. Sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 58:213-221.

V. DISCUSIÓN GENERAL

1. *Listeria monocytogenes*: El riesgo está en los extremos de la distribución de dosis

En el estudio de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM) para *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos cocidos (Capítulo 4 de Resultados) se encontró que el riesgo poblacional (>65 años) estuvo asociado, en su mayor parte, con dosis elevadas del patógeno en el momento de consumo; dosis que, por otro lado, estuvieron en un ínfimo porcentaje de raciones (0,1%); o lo que es lo mismo, se situaron muy en el extremo derecho de la distribución de dosis, en el rango 9-11 log ufc/ración para el 40 % de las simulaciones de incertidumbre.

Gombas y col. (2003), tras un muestreo de 31.705 alimentos en puntos de venta de los Estados Unidos, encontraron una prevalencia que osciló, según la categoría, entre 0,17 y 4,7%, con un pequeño porcentaje de muestras con niveles superiores a 100 ufc/g. Sin embargo, estos niveles de prevalencia aún podrían ser mayores como se demuestra en el estudio de Vitas y col. (2004), con un 9% de las muestras de productos cárnicos cocidos contaminadas con *L. monocytogenes*. Basado en un conjunto más extenso de datos, nuestro estudio (Capítulo 4 de Resultados) utilizó valores de prevalencia en torno al 6 % al nivel de venta como valor medio de las simulaciones de incertidumbre.

Como consecuencia de la alta prevalencia del patógeno en los alimentos, parte de la población estaría expuesta de manera habitual a dosis del patógeno por debajo del umbral de infección (~5%); es más, entre 3-10% de la población podría ser portadora asintomática de *L. monocytogenes* en el tracto gastrointestinal (Schlech, 2000). Estos datos demostrarían, dada la baja tasa de incidencia de la enfermedad, que la listeriosis se encuentra asociada a dosis altas (Hitchins, 1996; Norrung, 2000) como ha sido puesto de relieve en nuestro estudio (Capítulo 4 de Resultados). No debemos olvidar que estamos hablando de un microorganismo tradicionalmente considerado oportunista, y que, por tanto, produce enfermedad en muy raras ocasiones aunque la sintomatología, cuando aparece, sea de extremada gravedad.

La población normal, raramente desarrolla enfermedad, sin embargo, grupos de alto riesgo, como mujeres embarazadas, ancianos, o personas inmunodeprimidas presentan unos umbrales de infección mucho más bajos, proliferando así la enfermedad, que, según los casos, puede llegar a producir serias consecuencias sobre la salud (abortos, infección en el feto, meningitis, septicemia, etc.) incluyendo la muerte en un importante número de casos (20-30%) (Gellin y Broome, 1989). Los estudios epidemiológicos sobre brotes encuentran frecuentemente que el mayor porcentaje de afectados corresponden a grupos de riesgo, entre los que destacan las mujeres embarazadas y personas mayores de 65 años (CDC, 2000). En este sentido, nuestros resultados indicaron una elevada tasa de incidencia de listeriosis (0,002%) para el consumo de productos cárnicos cocidos por la población anciana (Capítulo 4 de Resultados)

2. Importancia de la refrigeración a nivel doméstico en la incidencia de listeriosis.

El estudio del Capítulo 4 de Resultados evidenció el papel crucial que juegan tanto el tiempo, como la temperatura de refrigeración en el ambiente doméstico en el riesgo de listeriosis. El análisis de sensibilidad indicó que, entre los dos factores, el tiempo fue el de menor impacto sobre la estimación final de casos, identificándose un valor umbral de riesgo de 5 días, por debajo del cual el número de casos de listeriosis se redujo de manera significativa. En el caso de la temperatura, el análisis de sensibilidad mostró un mayor efecto sobre el número de casos, situándose el umbral de riesgo alrededor de 7°C. De hecho, el análisis de las iteraciones reveló que las temperaturas entre 7 y 10°C fueron responsables del 67 % de los casos de listeriosis.

La refrigeración a temperaturas abusivas o la cocción a temperaturas insuficientes es el factor más frecuentemente implicado en las toxiinfecciones alimentarias (Robert, 1990).

La literatura es bastante extensa en cuanto a recomendaciones de temperaturas de refrigeración, estando estas en función del producto, proceso y tipo establecimiento considerado. La legislación indica los límites de temperatura que no deben superarse para cada grupo o categoría de alimentos, cuyo control, en muchos casos, se realiza dentro de los Planes Generales de Higiene (PGH) y/o los programas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC); además del propio control realizado por las autoridades sanitarias.

En el caso de refrigeradores domésticos, normas (criterios de proceso) o controles legales no pueden ser aplicados. En estos casos las campañas informativas o programas educacionales pueden ser de gran utilidad para concienciar a los consumidores en cuanto a este aspecto. No obstante, aunque los consumidores puedan reconocer el papel crucial de la temperatura del refrigerador en la aparición de toxiinfecciones (Angelillo y col., 2001), cuando se les pregunta sobre la temperatura de refrigeración más adecuada, responden no conocerla (FRPERC, 2005); o incluso en algunos casos parece haber una gran confusión en cuanto al valor. Se suele indicar, como recomendación, que temperaturas por debajo de 4 o 5°C impiden el desarrollo de microorganismos patógenos y mantienen de manera efectiva el crecimiento de microorganismos alterantes (USDA, 2005; CFIA, 2006).

En un trabajo reciente (Carrasco y col., 2007), comparamos datos de temperatura de refrigeradores domésticos en la ciudad de Córdoba (España) con valores de otros países. El rango de temperaturas medias entre estudios osciló entre 4 y 7°C aproximadamente, siendo próximo a 7°C en el estudio de Córdoba. En este estudio también se encontraron temperaturas máximas de hasta 15°C. En el estudio de Sergelidis y col. (1997), el 51% de los refrigeradores domésticos (en Grecia) funcionaron a temperaturas > 9°C. En este mismo sentido, Azevedo y col. (2005) publicaron que el 25 % de los refrigeradores domésticos en Portugal tuvieron temperaturas superiores a 10°C. Todos estos datos demuestran, aparentemente, la

dificultad de cumplir con las recomendaciones de $<5^{\circ}\text{C}$; e indican, únicamente atendiendo a los valores medios, que existiría una cantidad considerable de refrigeradores domésticos que permitirían el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Los resultados del estudio en el Capítulo 4 vienen a destacar la importancia de la refrigeración doméstica en la aparición de listeriosis por consumo de productos cárnicos cocidos. Sólo valores extremos de concentración fueron responsables de los casos de listeriosis, la mayoría de los cuales provinieron de raciones de producto en el punto de venta con niveles bajos o muy bajos del patógeno, que experimentaron un incremento considerable a temperaturas de refrigeración doméstica ($4-7$ o >7 log ufc/g). Estos resultados no son los únicos en el conjunto de estudios de ECRM realizados hasta la fecha han incidido sobre este aspecto. Por ejemplo, Yang y col. (2006) encontraron que el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la refrigeración en ambientes domésticos fue el factor que más contribuyó al riesgo de listeriosis por consumo de cárnicos cocidos.

Los valores de temperatura empleados en el modelo del Capítulo 4 de Resultados se encuentran en el valor más bajo del rango citado anteriormente (media= 4°C , Audit internacional/FDA (2000)), si bien el modelo pudo proporcionar valores por encima de este límite en un 31% de los casos, con una ocurrencia esporádica de temperaturas extremas $>16^{\circ}\text{C}$. Estas temperaturas altas sólo pudieron ocurrir junto a tiempos de almacenamiento reducidos, ya que ambas variables estuvieron correlacionadas negativamente, de modo que el aumento de una supuso la reducción de la otra (por ej., cuanto mayor fue la temperatura en el refrigerador, menor fue el tiempo de almacenamiento). Sin embargo, aún así, pudo crecer desde muy bajos niveles hasta valores de riesgo considerables, y producir así listeriosis. Las combinaciones de tiempo y temperatura que provocaron tales incrementos en la simulación no se correspondieron a valores extremos, aunque sí estuvieron por encima de los valores medios (por ej., $4-8^{\circ}\text{C}$ y <20 días). Esto significa que, aunque puedan ser establecidas medidas de control a lo largo de la cadena alimentaria para asegurar la cadena del frío, e impedir el desarrollo de *L. monocytogenes*, finalmente, estos se hacen inefectivos puesto que las temperaturas que normalmente presentan los refrigeradores domésticos posibilitan el crecimiento del patógeno hasta niveles de riesgo. En este sentido, en nuestro modelo, también se concluyó, al igual que en el estudio de FDA/USDA/CDC (2003), que la eliminación de temperaturas por encima de 7°C podría repercutir en una reducción de más del 95% del número de casos de listeriosis anuales.

Debido a la relativa eficacia que los programas educacionales tienen sobre los hábitos de los manipuladores (Howes y col., 1996; Powell y col., 1997), se hace necesario acompañarlos con el desarrollo y aplicación de otras medidas o estrategias de reducción del riesgo. Por ejemplo, la determinación de la fecha de caducidad basada en la distribución real de temperaturas en los ambientes domésticos en lugar de basada en las temperaturas recomendadas en el etiquetado del producto puede ayudar a establecer unos mayores niveles de seguridad durante la refrigeración en estos tipos ambientes. Al margen de estas actuaciones, modificaciones en la formulación del producto o la adición de nuevos conservantes (ácidos orgánicos, bacteriocinas, etc.) también podrían contribuir a reducir o impedir

el desarrollo de *L. monocytogenes* durante su almacenamiento (Muriana, 1996; Valero y col., 2006).

A través de la incidencia sobre el consumidor se puede lograr evitar que los alimentos, por descuido o mala manipulación, sean sometidos a temperaturas extremas o abusivas, que conducirían en muchos casos a un incremento del riesgo. Sin embargo, este mismo hecho nos hace plantearnos una pregunta el consumidor concienciado sobre el riesgo y conocedor de las temperaturas límite o críticas ¿podría hacer que un frigorífico funcionara a un valor no superior a 7°C?. Reformulando la pregunta en términos estadísticos, ¿el consumidor podría lograr reducir la temperatura media del refrigerador y la variación de este hasta el punto de que no se supere 7°C? Bien, la respuesta en un alto porcentaje de casos sería "NO"; Únicamente, a través de la puesta a disposición del consumidor de mejores tecnologías de refrigeración, y de la adaptación de estas a las peculiaridades climáticas de cada zona, se podrá lograr mantener el alimento a un valor seguro de temperatura. En este sentido, actualmente, se están desarrollando planes nacionales y autonómicos para la renovación de muchos de los equipos electrodomésticos que ya se encuentran obsoletos y que carecen de una tecnología adecuada. Seguramente, nuevos refrigeradores, con independencia de la formación de los consumidores en cuanto a temperaturas de refrigeración, ayudarán a reducir significativamente los casos de toxiinfecciones que se encuentran asociados a un crecimiento en refrigeración, como es el caso de *L. monocytogenes*.

3. Densidad Máxima de Población

La Densidad Máxima de Población (DMP) es un parámetro cinético que define la concentración celular máxima que puede alcanzar una población microbiana en un medio concreto para un conjunto de condiciones determinadas.

En el estudio de ECRM en el Capítulo 4 de Resultados se concluyó que los valores extremos que fueron responsables de casi la totalidad de casos de listeriosis (95%) estuvieron relacionados con el nivel máximo de la DMP establecido en el modelo para *L. monocytogenes*, y que dependió linealmente de la temperatura de refrigeración. Así, el estudio indicó que valores de temperatura > 7°C fueron mayoritariamente los responsables del 95 % de casos de listeriosis anuales. La explicación de estos resultados se encuentra en el hecho de que la temperatura de 7°C fue usada en el modelo como límite a partir del cual *L. monocytogenes* pudo alcanzar su DMP límite (7,5-8,5 ufc/g). Además, se demostró que pequeñas modificaciones en la DMP pudieron dar lugar a cambios muy significativos en los valores de riesgo (casos/año), destacando la importancia de su correcta inclusión en estudio de ECRM, y de la necesidad de desarrollar más completos y exactos modelos de DMP.

El control sobre la DMP, por tanto, nos proporcionaría una vía alternativa para impedir, durante su periodo de refrigeración doméstica, que *L. monocytogenes* alcance niveles de riesgo en el alimento, incluso, algunas veces, a pesar de que se presenten temperaturas por encima de la media (Mataragas y col., 2003).

Multitud de factores influyen sobre el parámetro DMP, entre ellos, se encuentran el tamaño de la población inicial, factores ambientales (T, pH, ácidos orgánicos, CO₂, etc.), sustancias tóxicas o antibióticos, y la microflora competidora (Coleman y col., 2003a). Sin embargo, aún no se encuentra definido en que medida influye cada uno de estos factores sobre la DMP, y qué grado de interacción existe entre ellos.

El estudio de Uhlich y col. (2006) no encontró diferencias significativas para la DMP de *L. monocytogenes* en queso a diferentes temperaturas, probablemente debido al mayor efecto de la microflora competidora. Por otro lado, Buchanan y Bagi (1999) afirmaron que cuando se cultivó *L. monocytogenes* con *Pseudomonas fluorescens*, la DMP varió en función del pH, actividad de agua y temperatura. Lu y col. (2005) encontraron que ciertas combinaciones de ácidos disminuyeron la DMP de *L. monocytogenes*, si bien, este efecto se hizo menos evidente según se aumentaba la temperatura de almacenamiento. Estos resultados ponen de manifiesto que una combinación adecuada de ácidos en el alimento y el control de temperaturas podrían ser una estrategia razonable para reducir el riesgo de listeriosis a través de la reducción de la DMP.

El efecto “Jameson” es una teoría que intenta explicar el efecto competidor entre microorganismos, y establece que niveles elevados de la DMP para una población bacteriana podrían suprimir el crecimiento de otras poblaciones presentes en el alimento (Stephens y col., 1997). Muchos autores explican este fenómeno acudiendo al ejemplo de una carrera de competición entre poblaciones microbianas por lograr la fase estacionaria; cuando una de ellas la alcanza, la otra se detiene o reduce muy significativamente su crecimiento, y así también su DMP. Una consecuencia de este hecho es que microorganismos con bajas tasas de crecimiento o con concentraciones iniciales pequeñas podrían verse más fácilmente inhibidos por otros con niveles más altos (Coleman y col. 2003b). No obstante, no todos los estudios están de acuerdo con este hecho, por ej., Walls y Scott (1996) demostraron que *Escherichia coli* O157:H7 pudo crecer en carne picada de vacuno con flora natural hasta niveles teóricos máximos de DMP (10 logs).

En relación con el efecto “Jameson”, en los últimos años, se ha estudiado con gran profusión la aplicación industrial de bacterias ácido-lácticas (“cultivos protectores”) y sus metabolitos para impedir o reducir el desarrollo de patógenos, entre ellos *L. monocytogenes*, en diferentes tipos de productos alimenticios, como curados o *listos para el consumo* (Bredholt y col., 1999; Alves y col., 2006). Aunque no se conoce muy bien el mecanismo inhibitorio, parece estar relacionado con factores tales como la producción de bacteriocinas o ácidos orgánicos (nisina, ácido acético, láctico, etc.), bajada del pH, competencia por nutrientes, además de un posible efecto sinérgico (Schillinger y Lucke, 1990; Skytta y col., 1991; Daeschel, 1992; Vandenberg, 1993). Este tipo de procesos pueden ocasionar tanto una inhibición total o parcial del crecimiento, como una reducción de la concentración presente en el alimento. Por ejemplo, Teixeira de Carvalho y col. (2006) mostraron que valores subletales de una bacteriocina producida por bacterias ácido-lácticas aisladas de salami italiano aumentó la duración del tiempo lag y disminuyó la DMP de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración. De la misma manera, el estudio de Nilsson y col. (2004) indicaron que la DMP de *L. monocytogenes* cayó entre 3 y 6

log cuando fue cultivada junto con *Carnobacterium piscicola* A9b bac y bac+, respectivamente.

La teoría del *Quorum sensing* estudia los procesos de comunicación celular y se fundamenta en el hecho de que la regulación de la expresión génica, mediada por señales bioquímicas, es dependiente de la densidad celular (Otero y col., 2005). Esta teoría ha proporcionado pruebas de que la densidad celular es un factor desencadenante de complejos procesos bioquímicos (bioluminiscencia, resistencia, etc.) algunos de los cuales parecen relacionarse con la expresión de genes de virulencia, como ha podido demostrarse para *L. monocytogenes* (Ermolaeva y col., 2004) o *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista (Otero y col., 2005). A pesar de ello, la información sobre los mecanismos y factores implicados es muy escasa, y aún necesitará mayor grado de desarrollo. Quizás, en un futuro más o menos próximo, a la luz de nuevas investigaciones, se pueda probar la eficacia de su aplicación en la reducción de enfermedades de *L. monocytogenes* y otros microorganismos patógenos oportunistas.

3.1. Modelos de densidad máxima de población en la ECRM

No es frecuente encontrarse en la literatura científica y en los estudios de ECRM con modelos de DMP propiamente dichos, como podría ocurrir en el caso de otros modelos secundarios (por ej., modelos de tasa de crecimiento y tiempo lag). Entre las causas pueden estar la dificultad de desarrollar modelos de DMP con una buena capacidad predictiva, o incluso, la falta de interés por modelar este parámetro. Como alternativa para incluir este parámetro en la ECRM, se desarrollan estrategias de modelado de carácter más sencillo.

Los modelos de la DMP de *L. monocytogenes* desarrollados en los Capítulos 3 y 4 de Resultados asumen que la DMP es exclusivamente dependiente de la temperatura de refrigeración, sin considerar, por ejemplo, el efecto de la microflora acompañante. No obstante, puesto que la temperatura es el factor que va a determinar en mayor medida tanto el crecimiento del patógeno, como el de otras poblaciones microbianas, su consideración puede llevar a una estimación, más o menos aproximada, de su efecto conjunto sobre el DMP.

Otro ejemplo del uso de límites de crecimiento, a través de la aplicación de un parámetro DMP, es la ECRM de *L. monocytogenes* en leche pasteurizada (FAO/WHO, 2004). En este estudio, se aplicó un procedimiento similar al realizado en los capítulos 3 y 4 de Resultados, obteniéndose un resultado similar, esto es, el DMP fue raramente aplicado en la simulación. No obstante, no se proporcionó información sobre el impacto de este pequeño porcentaje de raciones con DMP sobre la estimación del riesgo final (casos/año), que como vimos en nuestro estudio en el Capítulo 4 de Resultados puede llegar a ser determinante.

El estudio de ECRM de *L. monocytogenes* en pescado ahumado envasado al vacío (FAO/WHO, 2004) incluye el efecto de la microflora acompañante a través de un modelo de crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL). Cuando las BAL llegan a ciertos niveles de concentración (DMP), el crecimiento de *L. monocytogenes* se hace más lento. Esto se lleva a cabo en el modelo aplicando un factor de reducción

sobre la tasa de crecimiento de *L. monocytogenes*. El estudio, además, demostró que la incertidumbre sobre este tipo de modelos (el efecto de las BALs en el crecimiento del patógeno) tuvo un gran impacto sobre la incertidumbre total del modelo.

El estudio de ECRM para *Salmonella enteritidis* (FSIS/USDA, 2005b) también introdujo un límite de crecimiento para describir la DMP, además de un factor de reducción de la tasa de crecimiento basado en los planteamientos matemáticos de Baranyi y Roberts (1995), y no en la interacción entre poblaciones microbianas. Este factor es dependiente del tiempo, y se hace mayor a medida que la concentración se acerca al nivel DMP. En otro estudio de ECRM para *Salmonella* spp en alimentos listos para el consumo (FSIS/USDA, 2005a) se utilizó un único valor para describir la DMP (8.5 log ufc/g). No obstante, el valor utilizado fue basado en datos experimentales de competencia con flora competitiva procedentes del estudio de Tamplin (2002). Un enfoque similar se siguió en el estudio de ECRM de *Vibrio vulnificus* en ostras, donde se asignó un valor puntual de 6 log ufc/g como DMP basado también en estudios experimentales. En ninguno de estos estudios se analizó el efecto del modelo de DMP sobre la estimación final del riesgo. Sin embargo, en el caso de *Salmonella* spp es de suponer que el impacto de la DMP fuese de menor significación que para *L. monocytogenes*, dado que bajas dosis de *Salmonella* (<100 ufc/g), lejos todavía del nivel de DMP, están asociadas a una relativamente alta probabilidad de infección (FAO/WHO, 2002a). Este hecho también podría extrapolarse a otros microorganismos patógenos con dosis infectivas bajas o muy bajas, como por ej., *E. coli* O157:H7; en estos casos, la consideración del DMP en el modelo puede no ser relevante en la estimación del riesgo final. En este mismo sentido, el estudio realizado por Lindsqvist y col. (2002) para evaluar el riesgo asociado a *Staphylococcus aureus* por consumo de queso no utilizó DMP alguno para limitar el crecimiento del patógeno ya que se consideró que valores por encima del rango 5-6 log ufc/g, aún no el DMP, son ya significativos en la producción de la enterotoxina.

En definitiva, los datos aquí discutidos, muestran la variedad de estrategias utilizadas a la hora de incluir la DMP en la ECRM. De hecho, parece que muchas veces la limitada información sobre este parámetro condiciona el tipo de modelo, de modo que lo deseable sería utilizar una combinación de todos ellos para así incluir de la manera más completa posible el efecto los factores implicados (por ej., pH, Temperatura, flora competitiva, etc.). Además, destacamos la importancia de incluir este parámetro en los estudios de ECRM para una correcta estimación del riesgo. No obstante, su impacto puede ser mínimo en el caso de microorganismos patógenos con dosis infectivas bajas, como en el caso de *E. coli* O157:H7. Por otro lado, también destacamos la necesidad de incluir modelos de competencia, no sólo para encontrar una mayor exactitud en las predicciones de crecimiento en valores de tiempo de lag o de tasa de crecimiento, sino también, para obtener una estimación de DMP más exacta y fiable, tan importante, por ej., en el caso del riesgo asociado a *L. monocytogenes*.

4. Estrategias para el control de *Listeria*

En el Capítulo 4 de Resultados se pone de relevancia el hecho de que **la listeriosis es una enfermedad asociada a eventos de muy baja probabilidad**. Situaciones con baja de probabilidad son más difícilmente detectables, y por tanto controlables. Por otro lado, el diferente grado de susceptibilidad en la población, junto a la amplia distribución de *Listeria* en los alimentos y su carácter psicrotrofo plantean cierta dificultad en cuanto a su control y gestión.

Las políticas nacionales sobre este patógeno son diversas, y en algunos casos, de cierta complejidad, como veremos más adelante. Sin embargo, dos enfoques o tipos de estándares parecen ser los más extendidos. El primero hace referencia a lo que se llama “tolerancia cero”, es decir, se busca la ausencia del patógeno para reducir el número de casos anuales. Por otro lado, tenemos “el enfoque tolerancia no cero” donde se permite un cierto grado de contaminación, ya que se entiende que esta se encuentra muy por debajo del umbral infeccioso. Un claro ejemplo del primer caso es Estados Unidos, donde el estándar es ausencia en 25 g, lo que se asemeja al caso de *Salmonella* en la legislación española. En relación al segundo enfoque, países como Francia, Alemania y Holanda han aceptado como nivel seguro valores ≤ 100 ufc/g. Hasta la fecha, no parece haber evidencias claras si uno u otro son realmente efectivos en el control de la listeriosis (FAO/WHO, 2006).

Por otro lado, países como Canadá y Dinamarca mantienen una política de “tolerancia cero” para algunos alimentos y de “tolerancia no cero” para otros. En el caso de Canadá, este último estándar se aplica a productos (Categoría 3) que no hayan estado asociados a brotes del patógeno y que, además, no impliquen un periodo de refrigeración superior a 10 días (Health Canada, 2004). En el caso de que el alimento sea consumido con frecuencia por poblaciones susceptibles o de riesgo, se clasificaría en categorías 1 y 2, donde se pide ausencia del patógeno. Para Dinamarca, sin embargo, se consideran 7 categorías de alimentos, donde el estándar se modifica en función del conjunto de factores de riesgo en el alimento, como periodo de almacenamiento, susceptibilidad de la población a la que se destina, etc. Por ejemplo, para alimentos crudos *listos para el consumo* (por ej., vegetales de cuarta gama) el estándar habla de una concentración entre 10-100 ufc/g (Nørrung y col., 1999). La nueva reglamentación alimentaria europea (Reglamento CE 2073/2005) parece nutrirse de los planteamientos desarrollados en Canadá y Dinamarca, y desarrolla una política a medio camino entre los dos, estableciendo alimentos para los cuales hay una “tolerancia cero” y alimentos para los que hay un rango de concentración permitido cuando las características propias del alimento no permitan crecimiento o cuando el industrial pueda demostrar que el nivel de concentración no superará 100 ufc/g a lo largo de su vida comercial. Este aspecto fue puesto de relevancia en nuestro estudio (Capítulo 4 de Resultados), observándose que una doble estrategia según si el alimento permite crecimiento o no, puede ser de gran ayuda en el control del patógeno y de la listeriosis.

Nuestro estudio en el Capítulo 4 de Resultados pudo comprobar, para el caso de población anciana en los Estados Unidos, que la eliminación de niveles >100 ufc/g del patógeno en el punto de venta, antes de la refrigeración a nivel de consumo

doméstico, no disminuyó significativamente el número de casos/año. De hecho, desde un punto de vista de gestión, su baja presencia, hace difícil su control a través de programas de muestreo.

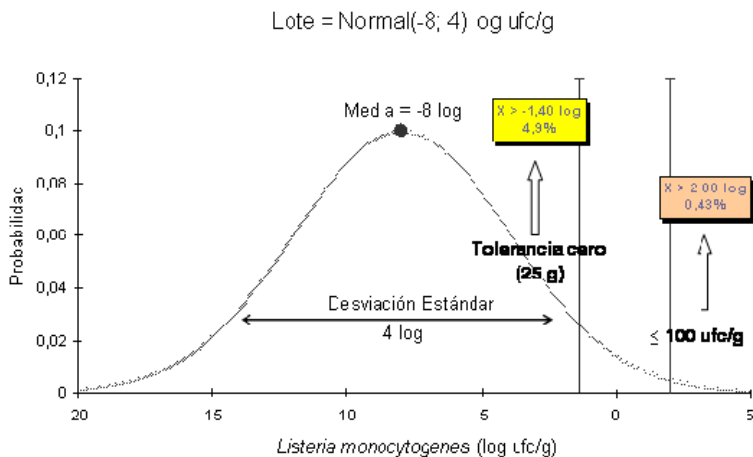


Figura 4.1 Distribución de Listeria monocytogenes en un lote de producto

Para ilustrar lo indicado anteriormente, usaremos un plan de muestro $n=20$; $c=0$ para el límite (m) ≤ 100 ufc/g (muestra = 25 g) sobre un lote contaminado que presenta una distribución Normal; en concreto, usaremos la distribución media de las empleadas en el estudio del Capítulo 4 de Resultados, esta es la Normal (-8; 4) log (ver Figura 4.1). Aplicando las bases estadísticas que sustentan los planes de muestro, esto es, el proceso Binomial, obtenemos que la probabilidad de aceptar el lote es casi de un 99%, lo cual demuestra la incapacidad de estos tipos de planes para detectar lotes con raciones por encima del límite.

En el modelo se observó que la eliminación de raciones con niveles bajos o muy bajos (< 10 ufc/g), supuso una reducción efectiva y significativa del riesgo. Estas raciones fueron más abundantes en el punto de venta, sin embargo, muchas de ellas tuvieron concentraciones muy por debajo de los límites de detección habitualmente aplicados para la detección del patógeno ($< 0,04$ ufc/g). Por esto, podría ser que los planes de muestro actualmente utilizados no fueran efectivos en su detección. Por ejemplo, si usamos un criterio de ausencia en 25 g, para $n=5$ y $c=0$ (Regulation (EC) No 2073/2005), basados en el lote contaminado arriba empleado, y sobre los mismos principios anteriormente indicados, la probabilidad de aceptarlo sería sólo de un 78%. Aunque con una menor probabilidad que en el anterior caso de aceptar un lote defectuoso, el valor aún se encuentra muy por encima de lo aceptable, mostrando, por tanto, la ineficacia de este plan para detectar los lotes contaminados. Además, debemos considerar el hecho de que los industriales son reacios, en un gran porcentaje de los casos, a llevar a cabo tales planes de manera continuada (NZFSA/ESR, 2002), incluso pueden ocultar los resultados cuando son positivos (Todd, 2003). Imaginemos que el industrial sólo lleva acabo un control del 25% de los

lotes producidos, en este caso, sólo tendríamos una probabilidad del 5% de detectar el lote defectuoso.

Estos datos y ejemplos numéricos explican por sí mismos porqué los dos tipos de estándares no producen, en la prácticas, diferencias significativas en la reducción de los casos listeriosis. Parece que la inherente capacidad de *L. monocytogenes* para crecer desde concentraciones difícilmente detectables a temperaturas de refrigeración doméstica, no especialmente extremas; y la dificultad de los consumidores para llevar a cabo unas buenas prácticas de conservación son los factores mayoritariamente implicados en el riesgo de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos.

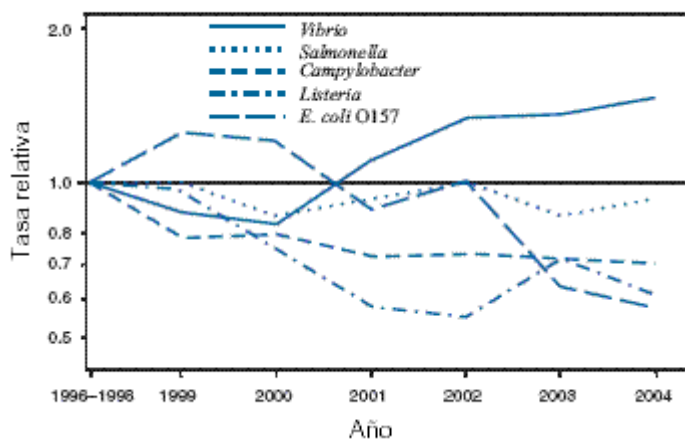


Figura 4.2. Tasas relativas comparadas con el periodo base 1996-1998 de casos de infección diagnosticados en laboratorio originados por *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157, *Listeria*, *Salmonella*, y *Vibrio* anuales - *Foodborne Diseases Active Surveillance Network, United States, 1996-2004* (adaptado de CDC, 2005)

4.1 ¿Cuál es el enfoque correcto para la disminución del número de casos de listeriosis?

Durante los últimos años, los casos de listeriosis se han visto reducidos en un importante número de países. Por ejemplo, un 40 % (IC: 25-41 %) en los Estados Unidos en el periodo 1996-2004 (CDC, 2005) y un 27 % en Francia desde 1999 a 2003 (Goulet y col., 2006), alcanzándose en ambos una tasa de incidencia similar, a pesar de tener estándares distintos. Contrariamente, en el caso español, entre 1999 y 2005, se registró un incremento de 32 a 100 casos anuales, lo que corresponde con un porcentaje de cambio del 100%, situándose así la tasa de incidencia para 2005 en 1,57 casos por 1.000.000 habitantes (EFSA, 2005 y 2006). Probablemente, este incremento se deba más a una mejora en los sistemas de recopilación y análisis microbiológico que a, realmente, un incremento muy elevado del número de casos. A este respecto, debemos señalar que los datos recopilados en España corresponden

sólo a hospitalizaciones, lo que significa que la tasa real incluyendo casos que no han necesitado hospitalización sería aún mayor.

Los datos en el caso de los Estados Unidos, aunque positivos en números globales, obligan a reflexionar sobre la importancia de la implantación de políticas de tolerancia cero en la reducción de los casos de listeriosis. Recientemente, han ocurrido brotes importantes que han incidido puntualmente sobre la tasa anual de listeriosis (Figura 4.2). Este hecho se ha visto confirmado con los últimos datos de incidencia correspondientes al año 2005, donde la tasa de listeriosis estuvo en 3 casos por millón de habitantes, un dato similar al del año 2000 (CFA, 2006). Adelantándose a estos datos, diferentes agentes de la cadena alimentaria, en los Estados Unidos, han llevado a cabo una petición oficial para modificar la actual política de tolerancia cero para aquellos alimentos que no permitan crecimiento de *L. monocytogenes* (HHS/FDA, 2003).

Probablemente, los esfuerzos preventivos a través de programas específicos (BPH, BPE, métodos de desinfección, campañas informativas y formativas, etc.) han tenido un papel determinante en la reducción de listeriosis (Goulet y col., 2001); en nuestra opinión, mayor que la propia aplicación de los estándares microbiológicos aquí discutidos. Aunque también cabe pensar, en un sentido general, que el gran desarrollo tecnológico acometido por la industria alimentaria en los últimos años, y la mayor concienciación sobre aspectos de seguridad alimentaria, como consecuencia de las mayores exigencias de un mercado global cada vez más competitivo, han repercutido sobre la reducción de la listeriosis al igual que también ha ocurrido para otros microorganismos patógenos (Todd, 2003).

Todo esto nos plantea la siguiente pregunta, ¿habremos llegado al límite en la reducción de casos de listeriosis? Bien, si tenemos en cuenta la dificultad de controlar los factores de riesgo puestos de manifiesto en nuestro estudio (crecimiento a temperaturas de refrigeración doméstica, ubicuidad, alta incidencia, etc.), junto a lo esporádico de su incidencia a pesar de su gravedad (2500 casos y 500 muertes anuales en EEUU, Mead y col. 1999) parece razonable pensar que muy difícilmente se podrán reducir los casos de listeriosis de una manera definitiva (“no existe riesgo cero”), o más allá de un hipotético nivel. En consonancia con esta afirmación, recientemente, FAO/WHO (2006) indicó, entre las posibles medidas de gestión para la reducción de los casos de listeriosis, mantener el *status quo* y no aplicar ninguna medida en especial. De hecho, un pequeño fallo en el control de la temperatura de un lote contaminado pueden llevar a un brote de listeriosis a pesar de todas las medidas preventivas y de control aplicadas, como hemos podido comprobar en nuestro estudio.

Durante muchos años se ha incidido sobre el aspecto de que el control rutinario sobre el producto final no es garantía de ausencia de patógenos, ni productivo para la industria; capítulos y libros se han escrito justificando su ineficacia, y defendiendo el desarrollo de sistemas de gestión del riesgo (por ej., el sistema APPCC) como una alternativa más eficaz. En este sentido, el beneficio de la implantación de este tipo de programas, tipo APPCC, está ampliamente demostrado vista la progresivamente reducción de enfermedades alimentarias observadas en países desarrollados durante los últimos decadas (FAO/WHO 2002b). Por otro lado, también es cierto que, cada

vez, se hace más difícil reducir la incidencia para algunos microorganismos patógenos como *Salmonella* o *Listeria*, este último aquí discutido.

Nuevos métodos de análisis o nuevas estrategias de reducción del riesgo actualmente en desarrollo podrían abrir nuevas puertas al control de microorganismos patógenos alimentarios y sus enfermedades. Avances en biosensores, técnicas de detección en línea como el NIR (“Near Infrared Spectroscopy”), ELISA y PCR han mejorado la capacidad de detección de microorganismos patógenos con una importante reducción de los costes, incluso llegando su aplicación a la etapa de consumo doméstico, como es el caso de los biosensores, que colocados sobre los alimentos pueden ayudar a detectar su presencia cuando superan un cierto límite. Además, nuestra comprensión sobre los mecanismos de transmisión en alimentos y de patogenia nos están dando la posibilidad de nuevas y distintas estrategias de reducción del riesgo (por ej., reduciendo la densidad poblacional, se puede reducir la expresión de genes de virulencia).

5. La Transferencia microbiana: Factores de riesgo

La transferencia microbiana es uno de los factores de riesgo más relevantes en la aparición de toxiinfecciones alimentarias (Capítulo 1 de Resultados), como demuestran los informes epidemiológicos sobre brotes y casos alimentarios que anualmente se publican en cada país. Por ejemplo, Finlandia y Francia informaron que el 38 % y 43 % de las toxiinfecciones alimentarias (con factor causante identificado) en el bienio 1999-2000 fueron causados por fenómenos de transferencia microbiana (WHO, 2003a y 2003b). Sin embargo, paradójicamente, es también el proceso menos conocido y estudiado, si lo comparamos con otros como el crecimiento o muerte bacteriana (Capítulo 1 de Resultados). En los últimos años, algunos autores han incidido sobre este aspecto y han señalado la importancia de llevar a cabo un mejor y mayor análisis de la información epidemiológica disponible con objeto de dilucidar qué rutas de contaminación cruzada son las más probables o qué factores favorecen más la aparición del fenómeno (Den Aantrekker y col., 2003; Reij y col., 2004).

La visión clásica que se tiene de los procesos de transferencia microbiana encuentra su mejor ejemplo en los programas educacionales y guías, que centran parte de sus esfuerzos en mostrar cómo evitar que un alimento entre en contacto con una superficie o zona contaminada, mediante la separación entre productos crudos (la fuente de contaminación) y alimentos ya manufacturados (alimentos listos para el consumo, cocidos, etc.) y/o la reducción de la contaminación en estas a través de la correcta ejecución de las prácticas de limpieza y desinfección (por ej., *L monocytogenes* en puntos de venta, USDA/AFDO, 2006).

Solo recientemente, los estudios han profundizado sobre los procesos que actúan durante la transferencia microbiana (Capítulo 2 de Resultados,

Kusumaningrum y col., 2002; Vorst y col. 2006). Los datos generados en este tipo de estudios han permitido, en el Capítulo 1 de Resultados, identificar ciertos factores determinantes en la transferencia microbiana, y más concretamente bacteriana, estos son: la presencia de humedad, el tiempo de contacto o permanencia sobre las superficies contaminadas, y el grado de presión ejercido durante el contacto.

También, según nuestro estudio (Capítulo 1 de Resultados), las características físico-químicas de la superficie puede favorecer o dificultar la transferencia, según el grado de complementariedad o atracción entre la carga neta de la pared celular propia del microorganismo y la superficie. Digamos, que a mayor atracción (unión) entre superficie y microorganismo, menor grado de transferencia. Este factor ya ha sido mencionado por otros autores como un factor de influencia en la tasa de transferencia (Schaffner, 2004b). Por ejemplo, el estudio de Knobben y col. (2007) encontró que *S. aureus*, microorganismo de carácter hidrófilo, se transfirió en gran porcentaje a una superficie hidrófila pero, a continuación, a causa de su fuerte adhesión a esta superficie se transfirió en menor medida a otros materiales.

Reij y col. (2004) indicaron la necesidad de llevar acabo un diseño “higiénico” de equipos e instalaciones alimentarias, con el objeto de que los programas o prácticas de limpieza y desinfección puedan ser los más efectivos posibles en la reducción de la recontaminación. De la misma manera, el diseño podría considerar otros factores de riesgo, como los aquí identificados. Equipos que eviten condensación de agua sobre su superficie, evitarán, además de la supervivencia de microorganismos patógenos, el riesgo de transferencia al alimento, ya que la humedad ha sido identificada como un factor que favorece el aumento de la tasa de transferencia durante el contacto entre superficies contaminadas. También, el estudio de Wilks y col. (2005 y 2006) sugiere que el uso de ciertas aleaciones en el acero de superficies de utensilio, equipos o instalaciones alimentarias puede ayudar a reducir los fenómenos de contaminación cruzada a través de un efecto antimicrobiano que reduce su supervivencia sobre la superficie.

Por otro lado, la topografía de la superficie puede ser otro factor con influencia en la transferencia bacteriana (Whitehead y col., 2004). Rusin y col. (2002) afirmaron, basados en datos de su estudio, que la tasa de transferencia fue mayor para aquellos objetos con superficies lisas que para aquellos con superficies porosas. Estudios como los de Dawson y col. (2007), Knobben y col., (2007) y Midelet y Carpentier (2002) afirman que a mayor rugosidad o aspereza de la superficie menor grado de transferencia, puesto que las bacterias al colonizar depresiones o concavidades en la superficie se hacen menos accesibles a una posterior contacto, y por tanto, a la transferencia a la otra superficie.

Como se pone de manifiesto en el Capítulo 1 de Resultados, la reducción o el control de los factores de riesgo podría ser un medio efectivo para reducir los fenómenos de transferencia o su ocurrencia. Sin embargo, desde una perspectiva de gestión y comunicación del riesgo, parece difícil trasladar esta información de una manera directa a consumidores, manipuladores, y responsables de la gestión del riesgo en la cadena alimentaria, y ser al mismo tiempo efectiva. Este tipo información tiene un gran nivel de abstracción y es difícilmente interpretable en un contexto alimentario. Sin embargo, si podemos, a partir de esta información, identificar

aquéllas tareas vinculadas con factores de riesgo, podremos, a su vez, identificar estas como escenarios o actividades de riesgo. Este tipo de mensaje es más concreto, y puede ser entendido más fácilmente por la audiencia que no es técnica, en nuestro caso, trabajadores del sector alimentario, y consumidores.

Como se destaca en el Capítulo 1 de Resultados, la consideración de estos factores en el desarrollo de planes APPCC puede ayudar, si no a establecer puntos de control crítico (PCC), sí a orientar en el desarrollo e implantación de las prácticas higiénicas de manipulación más seguras o a identificar aquellas prácticas que puedan suponer un incremento en el riesgo de transferencia bacteriana. Por ejemplo, durante una fase de loncheado en un proceso de manufactura de jamón cocido, la acumulación de lonchas sobre las superficies de trabajo incrementaría la probabilidad de transferencia en el caso de que la superficie estuviera contaminada, ya que, como hemos indicado en dicho capítulo, a mayor presión sobre superficie, mayor la tasa de transferencia se obtiene.

6. Aspectos clave para incluir modelos de transferencia microbiana en la ECRM.

El proceso de transferencia microbiana en el ambiente alimentario puede ser de carácter bidireccional; no lineal (elementos interrelacionales); y/o cíclico (bucle), como se ilustra en la representación de la Figura 6.1 (Schaffner, 2004a; Pérez-Rodríguez, 2005). Esta complejidad en los fenómenos de transferencia microbiana hace más difícil su introducción en estudios de ECR que en el caso de otros tipos de modelos (por ej. modelos de crecimiento e inactivación). Como pone de relieve el Capítulo 3 de Resultados, la síntesis en escenarios de contaminación cruzada, como alternativa, además de facilitar el desarrollo matemático en un contexto de ECRM, se adapta al sistema de opciones de gestión que forman parte de un proceso de toma de decisiones (Pérez-Rodríguez, 2005). No obstante, en la escasa bibliografía existente también se pueden encontrar ejemplos de enfoques distintos al empleo de escenarios, como el modelo realizado por Ivanek y col. (2004) que se basó en procesos binomiales para describir la probabilidad de contacto, y por tanto de transferencia, entre diferentes elementos (guantes, manos, ambiente, alimento, etc.). También, el estudio de ECRM realizado por la FSIS/USDA (2003) diseño, en Visual Basic, un modelo de transferencia de *L. monocytogenes* en fábrica, interpretando esta como un sistema abierto, donde existe un flujo de entrada y salida de microorganismos. Sin embargo, ambos, por su complejidad matemática, se hacen poco claros, e inaccesibles para gestores del riesgo y otros agentes interesados, reduciendo así su aplicabilidad en los sistemas de Gestión del Riesgo.

El Capítulo 3 de Resultados es un claro ejemplo del diseño de diferentes escenarios para describir la transferencia de *L. monocytogenes* durante la manipulación de productos cárnicos cocidos loncheados. La aplicación del concepto objetivo de seguridad alimentaria (FSO) como criterio posibilita la valoración del riesgo asociado a cada escenario.

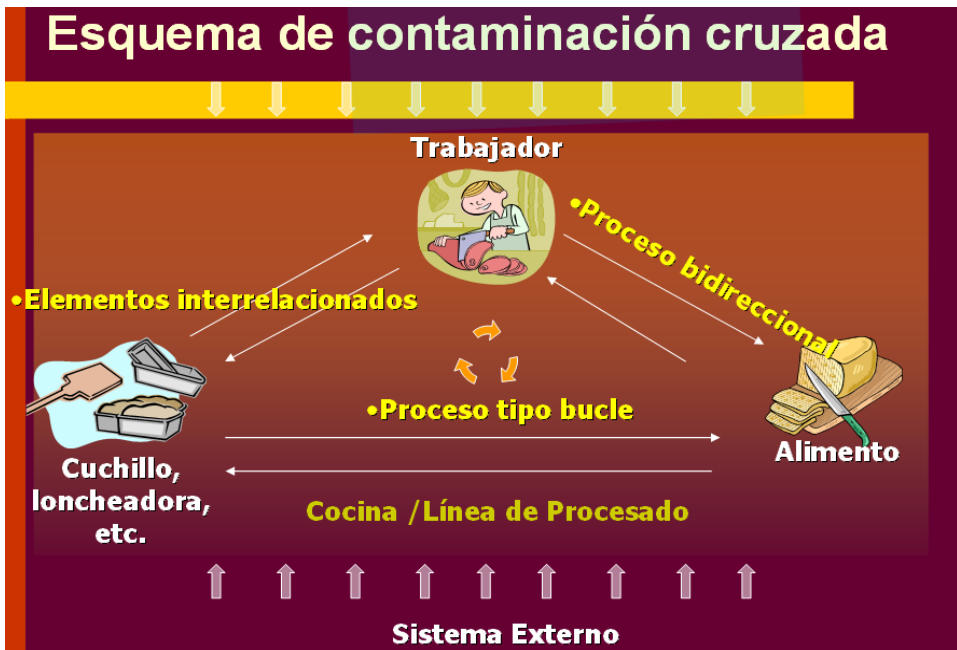


Figura 6.1. Representación de los elementos y procesos que intervienen en un fenómeno de contaminación cruzada (tomado de Pérez-Rodríguez, 2005).

Como un dato de especial interés surgido de este trabajo, está el hecho de que la transferencia de una sola célula de *L. monocytogenes* pudo dar lugar a niveles de riesgo siempre que las condiciones de refrigeración doméstica lo permitieron. Esta información está en consonancia con los resultados y conclusiones derivadas del Capítulo 4 de Resultados que, en líneas generales, vienen a decir que el riesgo de listeriosis principalmente se deriva de un crecimiento extenso durante refrigeración.

Por tanto, nuestro estudio sugiere, más allá de posibles dudas sobre la viabilidad de que una sola célula pueda lograr grandes incrementos, que los casos de listeriosis vinculada a procesos de transferencia microbiana depende del hecho, en sí, de si se existe o no transferencia, más que de la cantidad de células transferidas, esto es, de la tasa de transferencia, la cual parece ser más determinante para aquellos patógenos con dosis infectivas bajas como *E. coli* O157:H7, *Shigella* y algunos virus (Snyder, 1998). Estas diferencias, son importantes a la hora de diseñar, desarrollar y aplicar modelos de transferencia microbiana, y por ello, se deben considerar a lo largo del proceso de ECRM. Este hecho, además, pone de relevancia la importancia de seguir unas buenas prácticas higiénicas de manipulación, y de ahí, la conveniencia también de incidir sobre trabajadores y consumidores a través de campañas educativas, y de los programas de formación de manipuladores que actualmente exige la legislación española (RD 202/2000).

7. Eficacia del lavado de manos y del uso de guantes

El estudio cuantitativo de Evaluación de Exposición llevado a cabo en el Capítulo 3 de Resultados evaluó 9 escenarios de contaminación cruzada durante la manipulación de lonchas de un producto cárnico cocido considerando el lavado de manos y el uso de guantes como medidas higiénicas para reducir el riesgo de transmisión de *L. monocytogenes* a las lonchas. Los resultados de este capítulo destacan la facilidad de este patógeno para transferirse desde un producto cárnico crudo contaminado a lonchas de jamón cocido, a través de las manos, a pesar del lavado de manos y del uso de guantes. Todos los escenarios tuvieron cierta probabilidad de obtener lonchas contaminadas con el patógeno. El escenario 7 que fue el más seguro en la simulación y que correspondió a un uso de guantes correcto y al lavado de manos durante la manipulación de ambos productos también produjo un 0.25 % de las lonchas contaminadas. Además, todos los escenarios, incluyendo el escenario 7, pudieron alcanzar concentraciones $> 8 \log \text{ ufc/loncha}$.

En Estados Unidos se estimó que el 42% de los brotes alimentarios registrados durante el periodo 1975-1998 fueron causados por las manos de los manipuladores (Ayçiçek y col., 2004). Por otra parte, los exámenes microbiológicos llevados a cabo sobre las manos de manipuladores indicaron, con bastante frecuencia, la presencia de microorganismos indicadores asociados a una mala higiene; por ej., el estudio de Lues y Tonder (2007) encontró que el 88% de las manos estuvieron contaminadas con *S. aureus* y el 40 % fueron positivas para coliformes, entre los que se encontraba *E. coli*. Aunque no es muy frecuente, algunos estudios han llegado a aislar microorganismos patógenos de las manos de manipuladores, como el estudio de Kerr y col. (1993) donde el 7% de los manipuladores examinados en distintos establecimientos fueron positivos para *L. monocytogenes*. También, por ej., Byrne y col. (2000) aislaron *E. coli* O157:H7 en manipuladores en mataderos, aunque en este caso, las canales de vacuno habían sido artificialmente contaminadas previamente; de cualquier modo, este estudio demostró la capacidad de este patógeno para contaminar las manos durante las tareas habituales de manipulación en un matadero. Bloomfield (2003) destacó la importancia de la contaminación de alimentos a través de las manos en las toxiinfecciones originadas en el ambiente doméstico. En este sentido, Gorman y col. (2002) demostraron la capacidad de ciertos patógenos (*Salmonella*, *S. aureus*, *Campylobacter* y *E. coli*) para poder diseminarse entre distintos elementos y objetos, entre ellos las manos del manipulador, durante la manipulación de productos contaminados en la cocina doméstica.

Los manipuladores suelen, con frecuencia, no llevar a cabo unas buenas prácticas higiénicas de manipulación, favoreciendo así los fenómenos de transferencia microbiana al alimento. Por ejemplo, Little y Louvois (1998) recogieron que el 11 % de los manipuladores no se lavaron las manos cuando manipularon productos crudos y cárnicos cocidos directamente con manos sin guantes. Además, un estudio en Turquía sobre las actitudes de los manipuladores de alimentos encontró que solo el 5 % de los encuestados afirmaron lavarse las manos antes de manipular un producto listo para el consumo (RTE). Es más, un 40% contestó no

lavarse las manos antes de manipular este tipo de productos, lo que contrasta con el hecho de que solo un 2 % de los encuestados afirmó lavarse siempre las manos después de manipular un producto crudo (Baş y col., 2006).

Los resultados derivados del Capítulo 3 de Resultados demuestran que la reducción de *L. monocytogenes* a causa del lavado de manos, en el caso de que no se usen guantes, no fue suficiente para asegurar el cumplimiento del FSO (100 ufc/g). De hecho, según el análisis de varianza y el ranking de escenarios, los escenarios con y sin lavado de manos que no usaron guantes fueron clasificados en el grupo de riesgo más alto. Por tanto, en el caso de no poder usar guantes, se deberían aplicar otras medidas adicionales después de secarnos las manos. El uso de algún tipo de desinfectante incluido en la formulación del jabón, impregnando los guantes, o usado como producto por separado podría contribuir positivamente en la reducción del número de lonchas con concentración > FSO. El estudio de Macinga y col. (2003) evaluó la eficacia de dos tipos de guantes con propiedades desinfectantes obteniendo un desigual resultado, así para *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo una reducción máxima de hasta el 95%, sin embargo, para *S. aureus* se alcanzó una reducción máxima del 54%. Marples y Towers (1979) obtuvieron una eficacia del 95% para el lavado de manos, y un 99,99% cuando usaron alcohol al 70%. Estos valores son muchos más altos que los empleados en nuestro modelo, probablemente debido a que en nuestro caso, los datos fueron obtenidos de simulaciones experimentales usando voluntarios que en muchos casos no realizaban un correcto lavado de manos, lo cual se asemeja más una situación real. Así, sobre esta base de reducción, nuestro estudio indicó que un hipotético producto usado para aumentar la eficacia del lavado de manos tendría que alcanzar una reducción de alrededor del 80 % para así reducir a la mitad el número de lonchas con concentraciones > FSO. Asimismo, el desarrollo de programas educativos dirigidos a la mejora de la eficacia del lavado de manos podría contribuir positivamente en la disminución del riesgo.

Errores y un mal uso de los guantes (Pillely, 2000) son más que probables durante la manipulación del alimento. Factores de inhibición tales como la falta de personal, exceso de trabajo, olvido, etc. (Hugonnet y Pittet, 2000; Griffith, 2002) podrían ser la causa. El escenario 9 simulado en el Capítulo 3 de Resultados es un ejemplo de un mal uso de guantes: por error, el trabajador no cambian de guantes entre la manipulación de carne cruda (contaminada) y un alimento *listo para el consumo*. En este caso, el modelo obtuvo el mayor porcentaje de lonchas > FSO, muy cercano a los valores obtenidos cuando no fueron usados guantes para manipular ambos productos. Estudios como el de Legg y col. (1999) y Gill y Jones (2002) encontraron también que tanto el uso, como el no uso de guantes dieron lugar a niveles similares de contaminación. A este respecto, se debería considerar que la distribución usada para este escenario fue obtenida de un estudio previo con *L. monocytogenes* realizado por Pérez-Rodríguez y col. (2004), que fue distinto al usado en los restantes escenarios, donde se emplearon datos de *Enterobacter aerogenes* tomados de los estudios de Chen y col. (2001) y Montville y col. (2001). Esta particularidad pudo también influir sobre las diferencias entre este escenario y los restantes.

Algunos países como Estados Unidos han hecho obligatorio el uso de guantes cuando se manipulan alimentos crudos y alimentos *listos para el consumo* (por ej., jamón cocido) (1997 FDA Food Code 3-301.11). La falta de pruebas sobre la total eficacia del lavado de manos (Snyder, 1994) parece ser el principal argumento para mantener esta exigencia legal. Según los resultados del Capítulo 3 de Resultados, el uso de guantes para manipular el producto crudo fue más eficiente en la reducción del número de lonchas > FSO que cuando estos se usaron para manipular únicamente el alimento *listo para el consumo*. Basados sobre estos resultados, se podría sugerir, como una medida preventiva, que siempre que se manipule un producto crudo se usen guantes.

Los guantes son barreras que por sí solas no pueden impedir totalmente los fenómenos de contaminación cruzada, ya que estos son permeables a bacterias (Gill y Jones, 2002). Los estudios indican que las bacterias pueden transferirse a través de su superficie con una eficiencia o tasa de transferencia del 1-10 % (Montville y col. 2001; Heal y col. 2003). Además, otros investigadores han señalado que a pesar del uso de guantes, factores tales como la contaminación previa de las manos, crecimiento en el interior del guante, micro-roturas del guante etc. pueden posibilitar procesos de transferencia microbiana (Olsen y col. 1993, Fendler y col. 1998, Hugonnet y Pittet, 2000, y Jamal y Wilkinson, 2003).

Todos estos datos ponen de manifiesto la incapacidad que tienen el lavado de manos y el uso de guantes por separado para reducir totalmente el riesgo de contaminación cruzada. Esto nos lleva a recomendar, como una medida preventiva de mayor garantía, el uso combinado de ambos tipos de barreras (Paulson, 1996), como fue mostrado en el Capítulo 3 de Resultados, donde el escenario más seguro correspondió al escenario 7. No obstante, ningún escenario fue totalmente eficaz; y este escenario, aún siendo el más seguro, todavía pudo alcanzar esporádicamente niveles de riesgo (>8 log ufc/g). Este resultado incide sobre el hecho que el riesgo cero no existe y que, incluso, en las situaciones de mayor control, existe una pequeña posibilidad de aparición del peligro, o lo que es lo mismo de riesgo.

8. Transferencia de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 durante el loncheado de productos cárnicos cocidos

Los productos cárnicos cocidos son un grupo de productos alimenticios *listos para el consumo* de amplia aceptación en diferentes sectores de la población que se han vinculado, con cierta frecuencia, a brotes alimentarios causados por diferentes microorganismos patógenos, entre los que destacamos *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Salvat y col., 1995; Stevenson y Hanson, 1996; Simone y col., 1997; CDC, 1997).

El tratamiento térmico destinado, en parte, a eliminar la posible presencia de microorganismos patógenos, también destruye la microflora acompañante. Así, cuando el producto es recontaminado por un microorganismo patógeno, y las

condiciones favorecen su crecimiento, este lo hace con gran velocidad debido a la ausencia de microorganismos competidores.

Los datos indican que estos productos se contaminan durante los procesos de elaboración o manipulación (Hudson y Mott, 1993; Samelis y col., 1998; Lunden y col., 2002). Cuando ocurre en etapas iniciales, el posterior tratamiento térmico consigue destruir por completo los microorganismos patógenos, sin embargo, en etapas posteriores, la ausencia de tratamientos de inactivación, y la aparición de condiciones de crecimiento pueden dar lugar a niveles de riesgo en el alimento en el momento de consumo.

En el caso de *L. monocytogenes*, su ubicuidad y resistencia al estrés ambiental, junto a su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración hacen que su transferencia al alimento sea de especial significación en el riesgo final (Fenlon y col., 1996; Garrec y col., 2003). También, *S. aureus*, suele ser habitual en superficies de trabajo, utensilios y equipos (Sneed y col., 2004) debido a su gran resistencia al estrés hídrico (deseccación). Su presencia en la piel del manipulador constituye otra vía importante de diseminación del patógeno al alimento. Por otra parte, *E. coli* O157:H7 por su carácter gram – presenta una menor resistencia al estrés ambiental, con lo cual es menos frecuente sobre las superficies. El riesgo por *E. coli* O157:H7 se vincula más a la aparición de fenómenos de contaminación cruzada durante la manipulación de alimentos crudos y *listos para el consumo* (Morgan, 1998) siempre que el proceso no implique una permanencia excesiva del patógeno sobre la superficie.

El estudio sobre la transferencia de *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 a un producto cárnico cocido durante su loncheado (Capítulo 2 de Resultados) mostró que ambos patógenos tuvieron una tasa de transferencia particularmente baja en comparación con otros trabajos, donde se desarrollaron otros tipos de escenarios (Chen y col. 2001; Kusumaningrum y col., 2002). En estos últimos, donde el contacto fue de tipo estático entre superficies lisas, se alcanzaron tasas de transferencia de hasta el 100 % (Chen y col., 2001). Sin embargo, en el estudio del Capítulo 2 de Resultados, el valor máximo obtenido estuvo en torno al 13 % de tasa de transferencia, valor obtenido en el ensayo realizado para *S. aureus* con un nivel de inóculo de 8 log ufc/hoja. El estrés hídrico pudo ser una explicación a la baja tasa obtenida, puesto que células dañadas o muertas a consecuencia de este factor ambiental no pueden crecer en el agar aunque hayan sido transferidas al alimento. No obstante, los resultados del estudio de Vorst y col. (2004 y 2006) y Todd (2006), que cuantificaron la transferencia de *L. monocytogenes* durante el loncheado de productos cárnicos cocidos, fueron similares, obteniéndose una tasa máxima de transferencia del 15 %. Las similitudes en los valores de tasa de transferencia se deben, probablemente, a que ambos trabajos simulaban escenarios parecidos, si bien el microorganismo fue distinto.

En el caso de procesos de transferencia donde hay implicada una superficie rugosa o porosa, la tasas obtenidas son también especialmente bajas como mostró Rusin y col. (2002), con valores por debajo de 0,01 % para objetos como esponjas, paños de cocina y tejido de ropa. Sin embargo, en este caso, a diferencia de nuestro estudio, la baja tasa de transferencia se deriva de que los microorganismos incluidos

en depresiones o concavidades de la superficie, no pueden transferirse a otra superficie por contacto.

El Capítulo 1 de Resultados profundiza en la idea de que cada escenario de transferencia bacteriana puede tener asociado un patrón o perfil de tasa de transferencia definido y concreto. Por tanto, basándonos en los datos de nuestro trabajo (Capítulo 1 y 2 de Resultados), podríamos afirmar que en procesos donde el contacto entre superficies implica movimientos adicionales laterales o giratorios, como ocurre durante el loncheado, la tasa de transferencia del microorganismo es mucho más baja (Vorst y col., 2006; Todd, 2006). En este sentido, Todd (2006) afirmó que el movimiento giratorio de la hoja puede provocar que pequeños trozos del alimento se desprendan hacia distintas zonas de la loncheadora y del ambiente cercano, aumentando la diseminación del microorganismo, y, por tanto, disminuyendo la tasa de transferencia a la loncha. Por el contrario, en procesos de transferencia bacteriana que se deriven de un contacto estático y vertical entre superficies, como la transferencia desde una tabla de cortar a un alimento (vegetal o carne) durante su troceado, los valores son mayores. El estudio de Moore y col. (2003) es un ejemplo de este último donde se obtuvieron valores máximos de tasa de transferencia para *Salmonella* de hasta el 66 %.

Nuestro estudio ha demostrado que la transferencia de *S. aureus* estuvo influida por el nivel de inóculo usado en la hoja (Capítulo 2 de Resultados), obteniéndose las tasas de transferencia más altas cuando el inóculo utilizado fue el más alto (8 log ufc/hoja). En cambio, para *E. coli* O157:H7, no se observaron diferencias significativas entre niveles de inóculo, lo cual estuvo en línea con los resultados de Kusumaningrum y col. (2002) y Dickson (1990), quienes tampoco encontraron diferencias significativas para otros escenarios y microorganismos (*S. aureus*, *Campylobacter jejuni*, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes*). No obstante, el estudio de Montville y Schaffner (2003) concluyó que a menor concentración del inóculo inicial se observó mayor tasa de transferencia. Este dato entra en contradicción con los resultados obtenidos para *S. aureus* (Capítulo 2 de Resultados). Ciertos factores pueden explicar la divergencia entre estudios. En primer lugar, las diferencias en el tipo de microorganismo utilizado en cada estudio (por ej., gram +/-, adherencia, formación de agrupamiento celular y viabilidad sobre la hoja) pudo afectar a la tasa de transferencia y a su interacción con el nivel de inóculo. En segundo lugar, las diferencias en el tipo de escenario, y preparación del inóculo pudieron ejercer cierta influencia sobre su adherencia sobre la hoja, y en consecuencia sobre la tasa de transferencia. Por ejemplo, en nuestro estudio (Capítulo 2 de Resultados), el tiempo de permanencia de los microorganismos en la hoja previo a la transferencia fue de 50 min, sin embargo, en el estudio de Montville y Schaffner (2003) sólo fueron 30 minutos. Estas pequeñas diferencias pueden ser determinantes en el comportamiento y viabilidad del microorganismo, especialmente si este es gram – como en el caso de *E. aerogenes*. Por tanto, con los datos disponibles hasta el momento, es difícil extraer una conclusión definitiva con respecto al tipo de efecto del nivel de inóculo, aunque parece claro que este ejerce algún tipo de influencia sobre la tasa de transferencia. Además, otros factores podrían interactuar, explicando así las diferencias encontradas entre estudios. Recientemente, el estudio de Todd (2006) ha puesto de manifiesto que las tasas de transferencia desde la hoja de una

cortadora industrial con niveles de inóculo bajos (3 log ufc/hoja) fueron más elevadas que las halladas a niveles de inóculo más altos (5 log ufc/hoja).

Cuando los datos de transferencia (log ufc/loncha) fueron enfrentados a la variable número de loncha (hasta 20 lonchas en el proceso de loncheado) se pudo observar que la transferencia siguió un proceso de caída logarítmica (Capítulo 2 de Resultados). Este hecho sólo pudo evidenciarse para niveles de inóculo en la hoja de 8 y 6 log ufc/hoja para ambos microorganismos ($R^2 = 0,73-0,95$). En concordancia con estos datos, los trabajos de Vorst y col. (2004 y 2006) encontraron que la transferencia de *L. monocytogenes* durante el loncheado se ajustó también a un proceso logarítmico, el cual fue especialmente evidente a 8 log cfu/hoja para los distintos tipos de productos cárnicos ensayados ($R^2 > 0,92$).

Basado en la naturaleza logarítmica del proceso de transferencia, dos tipos de modelos pudieron ser ajustados, uno lineal-logarítmico y otro tipo Weibull (Capítulo 2 de Resultados). Los niveles de ajuste obtenidos para ambos microorganismos, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7, fueron muy similares, sin embargo, el modelo Weibull mostró un coeficiente de determinación ligeramente superior ($R^2 = 0,89-0,97$) y un mejor ajuste a los valores de transferencia de las primeras lonchas, tuvieron la más alta concentración. El trabajo de Todd y col. (2006) también realizó un ajuste de modelos a los datos de transferencia de *L. monocytogenes* desde una cinta transportadora a productos cárnicos cocidos con un nivel de inóculo de 3 log sobre la cinta. El estudio concluyó que todos los modelos evaluados (logarítmico-lineal, logístico y tipo Weibull) fueron equivalentes y podrían ser usados igualmente en estudios de ECRM. Este mismo estudio también ajustó modelos logarítmicos-lineales a los datos de transferencia de *L. monocytogenes* durante el loncheado de productos cárnicos cocidos cuando el inóculo usado fue 5 y 3 log ufc/hoja. Los resultados nuevamente confirmaron un buen ajuste a los datos, especialmente para 5 log ufc/hoja en el caso de pechuga de pavo cocida ($R^2 = 0,91$).

Otros autores también estudiaron la transferencia bacteriana a lo largo de un proceso secuencial, como es el caso del estudio de Wachtel y col. (2003) con *E. coli* O157:H7, sin embargo, a consecuencia del bajo inóculo empleado (~ 2 log ufc/50 cm²), sólo pudieron obtenerse resultados de presencia y ausencia. Los resultados indicaron que durante el corte sucesivo de 25 trozos de lechuga en una tabla de corte contaminada con el patógeno, este se transfirió de manera esporádica a lo largo de los 25 trozos. También el estudio de Vorst y col. (2004 y 2006) incidió en la naturaleza esporádica o aleatoria de la transferencia a bajos inóculos. Estos encontraron que a niveles de inóculo de 3 log ufc/hoja y 5 log ufc/hoja, un número variable de lonchas fueron negativas para el patógeno a lo largo de las 3 repeticiones del ensayo (30 lonchas). El nivel de inóculo más bajo empleado en nuestro estudio fue 4 log ufc/hoja. Los resultados de transferencia a este nivel de inóculo para *S. aureus* mostraron cierta aleatoriedad y una alta variación, probablemente debido a que el error del recuento fue mayor que la propia variación de la transferencia. En cambio, en el caso de *E. coli* O157:H7, únicamente pudieron ser obtenidos valores de presencia ausencia, aunque todas las lonchas fueron contaminadas con el patógeno (20 lonchas). En este último caso, aunque los valores transferidos son muy bajos, por debajo del límite de detección del método de análisis, la baja dosis

infectiva del patógeno (< 100 ufc) hace de este escenario, un escenario de un alto riesgo, ya que todas las lonchas podrían potencialmente conducir a un riesgo alto de infección, especialmente si tiene lugar crecimiento durante su refrigeración.

La naturaleza aleatoria de la transferencia bacteriana a bajos inóculos puede ser de relevancia en el riesgo final, ya que a mayor número de lonchas contaminadas, mayor grado de exposición al patógeno. Por ello, como comentamos anteriormente, este aspecto también debería ser considerado en el diseño y desarrollo modelos de transferencia bacteriana, quizás mediante la inclusión de modelos de probabilidad. Así, por ejemplo, los datos de presencia y ausencia obtenidos en los estudios de Vorst y col (2004 y 2005) podrían emplearse para la estimación de la probabilidad de contaminación de un producto loncheado en el caso de que la loncheadora se encuentre contaminada con *L. monocytogenes*.

En resumen, nuestros resultados (Capítulo 2 de Resultados) y los trabajos de Vorst y col. (2004 y 2006) evidenciaron la capacidad de *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* para contaminar productos cárnicos cocidos durante su loncheado incluso cuando fueron ensayados bajos inóculos (≤ 4 log/hoja). Estudios de campo confirmarían estos resultados. Por ejemplo, el estudio de Lundén y col. (2002) encontró que una cortadora industrial usada en distintas industrias fue una fuente de contaminación de *L. monocytogenes* durante el procesado de distintos tipos de productos cárnicos cocidos. Igualmente, Samelis y col. (1998) hallaron *L. monocytogenes* durante el procesado de jamón cocido, siendo el origen el equipo utilizado en la etapa de “masajeado” o “golpeo”. Por ello, la aplicación de unas correctas prácticas de limpieza y desinfección se hace imprescindible, junto un diseño adecuado de estos equipos que permita mantenerlos en unas condiciones higiénicas adecuadas. En el nivel doméstico, estas medidas deben ser combinadas con programas educacionales que hagan conscientes a los consumidores del riesgo asociado a los fenómenos de contaminación cruzada y de la necesidad de realizar una correcta limpieza de los equipos (por. ej., loncheadora doméstica). En nuestros resultados (Capítulo 2 de Resultados), el caso de *E. coli* O157:H7 a 4 log ufc/hoja, con una transferencia a todas las lonchas, podría representar un escenario de alto riesgo a nivel doméstico cuando un producto crudo contaminado con el patógeno ha sido utilizado en la loncheadora previo al loncheado de un producto cárnico cocido sin un proceso de limpieza entre ambos.

Referencias

- Alves V.F., R.C.R. Martinez, M.A.S. Lavrador, y E.C.P. de Martinis (2006). Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. *Meat Sci.* 74, 623 - 627.
- Angelillo, I.F., M.R. Foresta, C. Scozzafava y M. Pavia (2001). Consumers and foodborne diseases: knowledge, attitudes and reported behavior in one region of Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 161 - 166.
- Audits International y FDA (Food and Drug Administration) (2000). 1999 U.S. food temperature evaluation. <http://www.foodrisk.org/audits_international.htm>
- Ayçiçek, H., H. Aydoğan, A. Küçükaraşlan, M. Baysallar, y A.C. Baoustaoflu (2004). Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control* 15, 253 - 259.
- Azevedo, I., M. Regalo, C. Mena, G. Almeida, L. Carneiro, P. Teixeira, T. Hogg, y P.A. Gibbs (2005). Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control* 16, 121 - 124.
- Baranyi, J. y T.A. Roberts (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 199 - 218.
- Baş, M, A.S. Ersun, y G. Kivanc (2006). The evaluation of food hygiene knowledge, attitudes, and practices of food handlers in food businesses in Turkey. *Food Control* 17, 317 - 322.
- Bloomfield, S.F. (2003). Home hygiene: a risk approach. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 1-8.
- Bredholt, S., T. Nesbakken, y A. Holck (1999). Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gaspackaged meat. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 43 - 55
- Buchanan, R.L., y L.K. Bagi (1999). Microbial competition: Effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 16, 523 - 530.
- Byrne, CM., D.J. Bolton, J.J. Sheridan, D.A. McDowell y L.S. Blair (2000). The effects of pre-slaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 142 - 145.
- Carrasco, E., F. Perez-Rodriguez, A. Valero, R.M. Garcia-Gimeno, y G. Zurera (2007). Consumer behaviour and temperatura: Factors contributing to risk of listeriosis from ready-to-eat salads consumption. *J. Food Prot.*, en prensa.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention) (1997). Outbreaks of Staphylococcal food poisoning associated with precooked ham, Florida, 1997. *CDC-MMWR*. 46, 1189-1191 <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4650a1.htm>>
- CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2000). Multistate Outbreak of Listeriosis, United States. *CDC-MMWR*. 49, 1117 <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4950a1.htm>>

CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2005). Preliminary foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food, 10 Sites, United States, 2004. *CDC-MMWR*. 54, 352-356. <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5414a2.htm>>

CFA (Consumer Federation of America) (2006). CDC data show *Listeria* food poisoning rate increased in 2005. <www.consumerfed.org/pdfs/CFA_stmt_on_FoodNet_data_4.13.06.pdf>

CFIA (Canadian Food Inspection Agency) (2006). Food safety tips: kitchen food safety tips preventing foodborne illness. Cat. N°: A104-11/2005E. <<http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/concen/tipcon/kitchene.shtml>>

Chen Y, K.M. Jackson, F.P. Chea, y D.W. Schaffner (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross contamination rates in common foodservice tasks. *J. Food Prot.* 64, 72 - 80.

Coleman M.E., M.L. Tamplin, J.G. Phillips, y B.S. Marmer (2003a). 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.

Coleman, M.E., S. Sandberg, y S.A. Anderson (2003b). Impact of microbial ecology of meat and poultry products on predictions from exposure assessment scenario for refrigerated storage. *Risk Anal.* 23, 215 - 228.

Daeschel, M. (1992). Procedures to detect antimicrobial activities: Food storage and distribution. These products are normally biopreservatives of microbial Origin. Ray, B. and Daeschel, M. (Eds.). CRC Press, Nueva York. Pags. 57 - 80.

Dawson, P., I. Han, M. Cox, C. Black, y L. Simmons (2007). Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella Typhimurium* from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. *J. Appl. Microbiol.*, en prensa.

Den Aantrekker, E.D., R.M. Boom, M.H. Zwietering, y M. van Schothorst (2003) Quantifying recontamination through factory environments: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 117 - 130.

Dickson, J.S. (1990). Transfer of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* between beef tissue surfaces. *J. Food Prot.*, 53, 51-55.

Ermolaeva, S., S. Novella, Y. Vega, M.T. Ripio, M. Scotti, y J.A. Vázquez-Boland (2004). Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Molec. Microbiol.* 52, 601 - 611.

EFSA (European Food Safety Authority) (2005). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2004: Spain. <http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/monitoring_zoonoses/reports/1290.Par.0024.File.dat/report_2004_spain_edited3.pdf>.

EFSA (European Food Safety Authority) (2006). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2005: Spain. <http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/monitoring_zoonoses/reports/country_report_2005.Par.0017.File.dat/zoon_report_2005_Spain_en.pdf>

FAO/WHO (Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization) (2002a). Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Roma.

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2002b). Reduction of food-borne hazards, including microbiological and others, with emphasis on emerging hazards. GF 01/9. FAO/WHO global forum of food safety regulators, Marrakesh, 28-30 Enero 2002. <<http://www.fao.org/docrep/meeting/004/y1940e.htm>>

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. Technical report. <http://www.fao.org/es/ESN/jemra/listeria_en.stm>

FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) (2006). The use of microbiological risk assessment outputs to develop practical risk management strategies: metrics to improve food safety. A joint FAO/WHO expert meeting, 3-7 de Marzo, Kiel.

FDA/USDA/CDC (Food and Drug Administration/United State Department of Agriculture/Centers for Diseases Control and Prevention) (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of Ready-to-Eat Foods. <<http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>>

Fendler EJ, M.J. Dolan, y R.A. Williams (1998). Handwashing and gloving for food protection part I: Examination of the evidence. *Dairy Food Environ. Sanit.* 18, 814 - 823.

Fenlon, D. R., J. Wilson, y W. Donachie. (1996). The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 641–650.

FRPERC (Food Refrigeration and Process Engineering Research Centre) (2005). Consumer handling of chilled foods. <<http://www.frperc.bris.ac.uk/res/res19.htm>>

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/U.S. Department of Agriculture) (2003). Risk assessment for *Listeria monocytogenes* in deli meats. <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/97-013F/ListeriaReport.pdf>>

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/U.S. Department of Agriculture) (2005a). Risk Assessment for the impact of lethality standards on salmonellosis from ready-to-eat meat and poultry products. <http://www.fsis.usda.gov/PDF/Salm_RTE_Risk_Assess_Sep2005.pdf>

FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/U.S. Department of Agriculture) (2005b). Risk assessments of *Salmonella Enteritidis* in shell eggs and *Salmonella* spp. in egg products <http://www.fsis.usda.gov/PDF/SE_Risk_Assess_Oct2005.pdf>

Garrec, N., F. Picard-Bonnaud, y A. M. Pourcher (2003). Occurrence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of

- dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 275-283
- Gellin, B.G. y C.V. Broome (1989). Listeriosis. *J. Am. Med. Assoc.* 261, 1313 - 1320.
- Gill, C.O. y T. Jones (2002). Effects of wearing knitted or rubber gloves on the transfer of *Escherichia coli* between hand and meat. *J. Food Prot.* 65, 1045 - 1048.
- Gombas D.E., Y. Chen, R.S. Clavero, y V.N. Scott (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J. Food Prot.* 66, 559 - 569
- Gorman, R., S. Bloomfield, y C.C. Adley (2002). A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 143 - 150.
- Goulet, V., H. de Valk, O. Pierre, F. Stainer, J. Rocourt, V. Vaillant, C. Jacquet, y J.C. Desenclos (2001). Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 983 -998
- Goulet, V., C. Jacquet, P. Martin, V. Vaillant, E. Laurent, y H. de Valk (2006). Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003. *Eurosurveillance* 11, 79 - 81. <<http://www.eurosurveillance.org/em/v11n06/1106-322.asp>>
- Griffith, C. (2002). Foodborne pathogens, Hazard, risk analysis and control. Good practices for food handlers and consumers. Blackburn p C.W. and McClure P.J. (Eds). Woodhead publishing Limited, Cambridge. Pags.257-274
- Heal, J.S., A.W. Bloom, D. Titcomb, A. Taylor, K. Bowker y J.R.W Hardy. (2003). Bacterial contamination of surgical gloves by water droplets spilt after scrubbing. *J. Hosp. Infect.* 53, 136-139.
- Health Canada (2004). Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (FD-FSNP-048). <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_politique_toc_e.html>
- HHS/FDA (United States Department of Health and Human Services/ Food and Drug Administration) (2003). Amending 21 C.F.R. Part 109 to establish a regulatory limit for *Listeria monocytogenes* in foods that do not support its growth. <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/03/dec03/122403/03p-0574-cp00001-02-vol1.pdf>>
- Hitchins, A.D. (1996). Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 71 - 85
- Howes, M., S. McEwen, M. Griffiths, y L. Harris (1996). Food handler certification by home study: measuring changes in knowledge and behaviour. *Dairy Food Environ. Sanit.* 16, 737 - 744.
- Hudson, J.A. y S.J. Mott (1993). Presence of *Listeria monocytogenes*, motile aeromonads y *Yersinia enterocolitica* in environmental samples taken from a supermarket delicatessen. *Int. J. Food Microbiol.* 18, 333 - 337.
- Hugonnet, S. y D. Pittet (2000). Hand hygiene-beliefs or science? *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 348 - 354.

Ivanek, R., Y.T. Grönh, M. Wiedmann, y M.T. Wells (2004). Mathematical model of *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a fish processing plant. *J. Food Prot.* 67, 2288 - 2297.

Jamal, A., y S. Wilkinson (2003). The mechanical and microbiological integrity of surgical gloves. *ANZ J. of Surg.* 43, 140 - 143.

Kerr, K.G., D. Birkenhead, K. Seale, J. Major y P.P. Hawkey (1993). Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. *J. Food Prot.* 56, 525 - 527.

Knobben B.A.S., H.C. Van der Mei, J.R. Van Horn, y H.J. Busscher (2007). Transfer of bacteria between biomaterials surfaces in the operating room: an experimental study. *J. Biomed. Mat. Res. A.*, en prensa.

Kusumaningrum, H.D., G. Riboldi, W.C. Hazeleger, y R.R. Beumer (2002). Survival of food-borne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 227-236.

Legg, S.J., N. Khela, P. Madie, S.G. Fenwick, V. Quynh, y D.I. Hedderley (1999). A comparison of bacterial adherence to bare hands and gloves following simulated contamination from a beef carcass. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 69 - 74.

Little, C.L. y J. de Louvois (1998). The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom. *J. Appl. Microbiol.* 85, 177-1786.

Lindqvist, R., S. Sylvén y I. Vagsholm (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 155 - 170.

Lu, Z., J.G. Sebranek, J.S. Dickson, A.F. Mendonca, y T.B. Bailey (2005). Application of predictive models to estimate *Listeria monocytogenes* growth on frankfurters treated with organic acids. *J. Food Prot.* 68, 2316 - 2332.

Lues, J.F.R., y I. Van Tonder (2007). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control* 18, 329 - 332.

Lundén, J.M., T.J. Autio, y H.J. Korkeala (2002). Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *J. Food Prot.* 65, 1129 - 1133.

Manciga, D.R., J.W. Arbogast, T.L. Eastman, C.M. Beausoleil, D.S. Paulson, y M.J. Dolan (2003). Evaluation of the antibacterial efficacy of two food handler gloves with reported antibacterial properties. IFT'S international food safety and quality conference and expo, Orlando, Florida (EEUU), 5-7 de Noviembre.

Marples R.R., y A.G. Towers (1979). A laboratory model for the investigation of contact transfer of micro-organisms. *J. Hyg. (Lond)*. 82, 237 - 248.

Mataragas, M., E.H. Drosinos, y J. Metaxopoulos (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder

stored under vacuum or modified atmosphere at 4 ± 2 °C. *Food Microbiol.* 20, 259 - 265.

Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, y R.V. Tauxe (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 5.

Midelet, G. y B. Carpentier (2002). Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4015-4024.

Montville, R., Y.H. Chen, y D.W. Schaffner (2001). Glove barriers to bacterial cross contamination between hands to food. *J. Food Prot.* 64, 845 - 849.

Montville, R., y D.W. Schaffner (2003). Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 7188-7193.

Moore, C.M., B.W. Sheldon, y L.A. Jaykus (2003). Transfer of *Salmonella* and *Campylobacter* from stainless steel to romaine lettuce. *J. Food Prot.*, 66, 2231-2236

Morgan, B. (1998). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Northern Ireland. *Eurosurveillance weekly* [1812-075X], 41. <<http://www.eurosurveillance.org/ew/1998/981008.asp#3>>

Muriana, P.M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Prot.* 59(Suppl S), 54 - 63.

Nilsson, L., Y.Y. Ng, J.N. Christiansen, B.L. Jørgensen, D. Grótnum y L. Gram (2004). The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J. Appl. Microbiol.* 96, 133 - 143.

Nørrung, B. (2000). Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 162 - 167

Nørrung, B., J.K. Andersen, y J. Schlundt (1999). Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *J. Food Prot.* 53, 195 - 203.

NZFSA/ESR (New Zealand Food Safety Authority/Institute of Environmental Science & Research Limited) (2002). Risk profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats. FW0186. <www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/listeria-in-rte-meat.pdf>

Olsen, R.J., P. Lynch, M. B. Coyle, J. Cumming, T. Bokete, W.E. Stamm. (1993). Examination gloves as barriers to hand contamination in clinical practice. *JAMA* 270, 350 - 353.

Otero Casal, A.M., A. Muñoz Crego, M.I. Bernardez Hermida, y J. Fábregas Casal (2005). "Quorum sensing": El lenguaje de las bacterias. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza (España).

Paulson, D.S. (1996). To glove or to wash: a current controversy. *Food Quality* June/July, 60 - 64.

- Perez-Rodriguez, F. (2004). Looking for solutions for not available data in exposure assessment of cooked meat. Cost Action 920 on foodborne zoonoses, working group 3: quantitative risk assessment. Workshop on data needs in risk assessment, Pamplona (España), 28 - 30 de Junio.
- Perez-Rodriguez, F. (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. Cost Action 920 on foodborne zoonoses, working group 3: quantitative risk assessment. Workshop on data needs in risk assessment, Dubrovnik (Croacia), 26 - 28 de Junio.
- Pilley C. (2000). Washing Away Foodborne Illness. *Meat & Poultry*, May.
- Powell, S.C., R.W. Attwell, y S.J. Massey (1997). The impact of training on knowledge and standards of food hygiene: a pilot study. *Int. J. Environ. Health Res.* 7, 329 - 334.
- Reij, M.W., W.D. Aantrekker, W.D., y ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 1 - 11.
- Roberts, D. (1990) Foodborne illness, sources of infection: food. *Lancet* 336, 859 - 861.
- Rusin, P., S. Maxwell y C. Gerba (2002). Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and phage. *J. Appl. Bacteriol.* 93, 585 - 592.
- Samelis, J., A. Kakouri, K.G. Georgiadou, y J. Metaxopoulos (1998). Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *J. Appl. Microbiol.* 84, 649 - 660.
- Salvat, G., M.T. Toquin, Y. Michel, y P. Colin (1995). Control of *L. monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 75-81.
- Schaffer, D.W. (2004a). Mathematical frameworks for modeling *Listeria* cross-contamination in food-processing plants. *J. Food Sci.*, 69, 155-159.
- Schaffner, D.W. (2004b). Modeling microbial responses in foods. Chapter 10: Models-What comes after the next generation? CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Schillinger, U. y F.K. Lucke (1990). Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. *Fleischwirtsch.* 70, 1296 - 1299.
- Schlech, W.F. (2000). Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31, 770 - 775.
- Sergelidis, D., A. Abraham, A. Sarimvei, C. Panoulis, Pr. Karaioannoglou, y C. Genigeorgis (1997). Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 171 - 177.
- Simone, E., M. Goosen, S.H. Notermans, y M.W. Borgdorff (1997). Investigations of foodborne diseases by food inspection services in The Netherlands, 1991 to 1994. *J. Food Prot.* 60, 442-446.

- Skytta, E., W. Hereijgers, y T. Mattila-Sandholm (1991). Broad spectrum antimicrobial activity of *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosus* in minced meat. *Food Microbiol.* 8, 231 - 237.
- Sneed, J., C. Strohbehn, S.A. Gilmore, y A. Mendonca (2004). Microbiological evaluation of foodservice contact surfaces in Iowa assisted-living facilities. *J. Am. Diet. Assoc.* 104, 1722 - 1724.
- Snyder, O. P. (1994). Cross-contamination of glove when being put on. St Paul, MN: Hospitality Institute of Technology and Management.
- Snyder, O.P. (1998). Hand washing for retail food operations:a review. *Dairy Food Environ. Sanit.* 18, 149 - 162.
- Stephens, P.J., J.A. Joynson, K.W. Davies, R. Holbrook, H.M. Lappin-Scott, y T.J. Humphrey (1997). The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* 83, 445 - 455.
- Stevenson, J. y S Hanson (1996). Outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection associated with eating precooked meats. *Communicable Disease Report*, 6, Review n°. 8, R116-R118.
- Tamplin, M.L. (2002). The growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10°C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation and fat level. *J. Food Prot.* 65, 456 - 460.
- Teixeira de Carvalho, A.A., R. Aparecida de Paula, H.C. Mantovania, y C. Alencar de Moraes (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiol.* 23, 213–219.
- Todd, E.C.D. (2003). Microbiological safety standards and public health goals to reduce foodborne disease. *Meat Sci.* 66, 33 – 43.
- Todd, E. C. D. (2006). Quantitative transfer of *Listeria monocytogenes* to and from deli meats and slicing machines and conveyor belt. IAFF's 93st Annual Meeting, Phoenix (EEUU), 8-11 de Agosto.
- Uhlich, G.A., J.B. Luchansky, M.I. Tamplin, F.J. Molina-Corral, S. Anandan y A.C.S. Porto-Fett (2006). Effect of storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on queso blanco slices. *J. Food Safety* 26, 202 - 207.
- USDA (United State Department of Agriculture) (2005). Fact Sheet: Refrigeration and Food Safety. <http://www.fsis.usda.gov/Fact_Sheets/Refrigeration_&_Food_Safety/index.asp>
- USDA/AFDO (United States Department of Agriculture/Association of Foods and Drugs Official) (2006). El control de *Listeria monocytogenes* en establecimientos de venta al consumidor o al detalle. <http://www.afdo.org/afdo/resources/upload/ SpanControl_LM_Retail.pdf>
- Valero, A., E. Carrasco, F. Pérez-Rodríguez, R.M. García-Gimeno y G. Zurera (2006). Growth/no growth model of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, citric acid and ascorbic acid. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 91 - 100.

Vandenbergh, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic cultures and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev.* 12, 221 - 238.

Vitas, A.I., V. Aguado, y I. Garcia-Jalon, (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed food in Navarra (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 90, 349-356

Vorst, K. L., E. C. Todd, F. Perez-Rodríguez, R. McMasters, y E. T. Ryser, (2004). Transfer of *Listeria monocytogenes* from a delicatessen slicer to ready-to-eat meat products. IAFP's 91st Annual Meeting, Phoenix (EEUU), 8-11 de Agosto.

Vorst, K.L., E.C. Todd, y E.T. Ryser (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *J. Food Prot.* 69, 619 - 626.

Walls, I. y V.N. Scott (1996). Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J. Food Prot.* 59, 1331 - 1335.

Whitehead, K.A., J.S. Colligon, y J. Verran (2004). The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 143 - 151.

WHO (World Health Organization) (2003a). 8th report 1999-2000 of WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe: Finland. <<http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/CRs/fin.pdf>>

WHO (World Health Organization) (2003b). 8th report 1999-2000 of WHO Surveillance Programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe: France <<http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/CRs/fr.pdf>>

Wilks, S.A., H.T., Michels, y C.W. Keevil, (2005). The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 445-454.

Wilks, S.A., H.T. Michels y W. Keevil (2006). Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 93 - 98.

Yang H., A. Mokhtari, L. Jaykus, R.A. Morales, S.C.Cates, y P. Cowen (2006). Consumer phase risk assessment for *Listeria monocytogenes* in deli meats. *Risk Anal.* 26, 89 - 103.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

Primera: La Densidad Máxima de la Población (DMP) para *Listeria monocytogenes* es un parámetro clave en el desarrollo de modelos de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM), y su consideración es fundamental para la valoración del riesgo de listeriosis. Así, en el estudio de ECRM de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos se comprobó que dosis cercanas a la DMP fueron responsables de aproximadamente, el 95 % de los casos de listeriosis anuales en la población anciana (>65 años). Asimismo, pequeñas modificaciones sobre este parámetro produjeron importantes cambios en la estimación del riesgo de listeriosis.

Segunda: Las condiciones habituales de temperatura en los frigoríficos domésticos favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos hasta niveles de riesgo. Asimismo, el análisis de sensibilidad indicó que una reducción de las temperaturas frigoríficas por debajo de 7°C produciría una disminución importante del número de casos de listeriosis (~97 %). Una mayor concienciación por parte de los consumidores en cuanto a la importancia del mantenimiento de temperaturas adecuadas en los frigoríficos y una mejora tecnológica de los mismos, se proponen como medidas para la reducción del riesgo.

Tercera: La mayor fuente de incertidumbre sobre la estimación del riesgo de listeriosis procedió de los propios datos de prevalencia de *L. monocytogenes* usados en el modelo. Para incrementar la exactitud y precisión en la estimación del riesgo de listeriosis se recomienda el desarrollo de un mayor número de estudios de prevalencia, junto a un aumento de la sensibilidad de los métodos de análisis microbiológico.

Cuarta: La dificultad de detección de bajos niveles de *L. monocytogenes* en alimentos, cuestiona la eficacia de los actuales criterios microbiológicos establecidos en el Reglamento CE 2073/2005, ya que se comprueba que niveles por debajo del límite de detección en productos cárnicos cocidos pueden crecer hasta niveles de riesgo durante su almacenamiento en frigoríficos domésticos.

Quinta: De la revisión exhaustiva de datos sobre contaminación cruzada en alimentos, proponemos que esta sea interpretada como un fenómeno físico de transferencia bacteriana, donde tanto factores ambientales, como implícitos al microorganismo, determinan el grado de transferencia al alimento. Por tanto, desde esta perspectiva, un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en este fenómeno de transferencia pueden ayudar a identificar aquellas actividades y/o hábitos que implican un mayor riesgo de contaminación cruzada. Así, en este estudio, se concluyó que la presencia de humedad, presión, y tiempo de contacto son factores que incrementan la tasa de transferencia entre superficies. Si estos factores son reducidos

durante la manipulación del alimento, el riesgo de contaminación cruzada también se reduce.

Sexta: El estudio cuantitativo de Evaluación de Exposición de *L. monocytogenes* para los escenarios diseñados de manipulación de productos cárnicos cocidos prueba, a través de un análisis de sensibilidad, que el riesgo derivado de fenómenos de contaminación cruzada depende más de la existencia de transferencia que del número de células transferidas. Asimismo, se señala que la incertidumbre derivada de las distribuciones de tasa de transferencia puede tener un efecto importante sobre la estimación del número de raciones contaminadas, y por tanto, del riesgo final de listeriosis.

Séptima: Utilizado como criterio de riesgo el Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO) de *L. monocytogenes* en los 9 escenarios de contaminación cruzada, se observó que el mayor riesgo de superar este nivel, se produjo en aquellos casos donde no se utilizaron guantes y cuando el mismo par de guantes se usó para manipular distintos productos. Por el contrario, el escenario con menor riesgo, correspondió a la combinación del empleo de diferentes guantes y del lavado de manos.

Octava: *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* se transfirieron de forma logarítmica desde hojas contaminadas hasta un total de 20 lonchas, cuando se simuló un proceso de loncheado de productos cárnicos cocidos con tres niveles iniciales de contaminación (10^4 , 10^6 , 10^8 ufc/hoja). *S. aureus* mostró una mayor capacidad de transferencia que *E. coli* O157:H7, lo cual parece derivarse de una menor sensibilidad del primero al estrés ambiental. Estos resultados destacan la importancia de llevar a cabo unas buenas prácticas de limpieza y desinfección de equipos y utensilios alimentarios.

Novena: El modelo log-lineal y el modelo Weibull se proponen como modelos matemáticos muy adecuados para describir la transferencia logarítmica de *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* durante el loncheado de productos cárnicos cocidos. Estos modelos pueden ser aplicados de manera óptima en la Evaluación de Exposición dentro de un esquema de ECRM.

Décima: La presente tesis demuestra el gran potencial de la ECRM en la identificación de políticas y estrategias de reducción del riesgo dentro de un esquema de Análisis de Riesgos. Se constata que el diseño de escenarios es la forma más adecuada y sencilla de representar matemáticamente los fenómenos de contaminación cruzada. Igualmente, se destaca el uso del análisis de sensibilidad como un conjunto de métodos de índole estadístico que nos ayudan a detectar y estudiar en detalle los factores de riesgo.

GLOSARIO

- *Análisis “in silico”* - es un análisis realizado usando ordenadores en conjunción con herramientas informáticas.
- *Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC)* - un sistema que identifica, evalúa y controla peligros que son relevantes para la seguridad de los alimentos.
- *Análisis de riesgo* - un proceso que consiste en tres componentes: evolución del riesgo, gestión del riesgo y comunicación del riesgo
- *Análisis de sensibilidad*- Evaluación de la respuesta de un modelo a cambios en la estructura, metodología y variables.
- *Contaminación cruzada* – Es la transferencia, directa o indirecta, de bacterias o virus desde un alimento contaminado a otro no contaminado
- *Control*- situación en la que siguen los procedimientos correctos y se cumplen los criterios.
- *Criterio de aceptación* - condiciones que diferencian lotes o operaciones de alimentos aceptables de los inaceptables.
- *Criterio de rendimiento* - el efecto en la frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento que debería ser alcanzado por la aplicación de una o más medidas de control que proporciona o contribuye a un PO o un FSO.
- *Criterio por defecto* –criterio conservador que se fija para garantizar la seguridad de un alimento en las peores condiciones.
- *Equivalencia* - es la capacidad de diferentes sistemas de inspección y certificación para lograr los mismos objetivos
- *Escenario* - Es la descripción de uno de los posibles estados de un sistema físico.
- *Estándar o norma* – es un criterio obligatorio que es incorporado a la ley, regulación u ordenanzas.
- *Fase* - un punto, procedimiento, operación o etapa en la cadena alimentaria incluyendo las materias primas, desde la producción primaria hasta el consumo.
- *Función de densidad de probabilidad* – es la ecuación que describe el ratio de cambio de la función de probabilidad acumulada: $f(x) = dF(x)/dx$
- *Función de masa* – la ecuación que describe probabilidad de los valores (x) de una variable aleatoria discreta (X): $(p_x(x) = P(\{x\}))$
- *Función de probabilidad acumulada* – la ecuación que describe la probabilidad de que una variable X es menos o igual que x: $F(x) = P(X \leq x)$
- *Incertidumbre* – Es la carencia de conocimientos del observador sobre los parámetros que caracterizan un sistema físico.
- *“Input”* - Es el conjunto de variables (cuantitativas o cualitativas) que se utilizan para construir la relaciones existentes en un modelo
- *Límite crítico* – un criterio que diferencia lo aceptable de lo no aceptable
- *Medida de Control* - definido como “cualquier acción y actividad que puede

ser utilizada para prevenir o eliminar un peligro de seguridad alimentaria o reducirlo a un nivel aceptable” (FAO/OMS).

- *Medida sanitaria* – es toda medida aplicada para:
 - para proteger la vida y la salud de las personas y de los animales en el territorio del Miembro de los riesgos resultantes de la presencia de aditivos, contaminantes, toxinas u organismos patógenos en los productos alimenticios, las bebidas o los piensos;
 - para proteger la vida y la salud de las personas en el territorio del Miembro de los riesgos resultantes de enfermedades propagadas por animales, vegetales o productos de ellos derivados, o de la entrada, radicación o propagación de plagas;
 - para prevenir o limitar otros perjuicios en el territorio del Miembro resultantes de la entrada, radicación o propagación de plagas.
- *“Microbiología Predictiva”* - es el área de la microbiología que comprende el estudio de la respuesta microbiana frente a factores ambientales, y que tiene como objetivo principal evaluar desde un punto de vista de seguridad y calidad microbiológica las distintas fases en la cadena alimentaria, utilizando para ello el desarrollo de modelos matemáticos (crecimiento, inactivación, probabilidad, etc.).
- *Modelo* – es la representación (conceptual, experimental, matemática, etc.) de un proceso o sistema real con el fin de que pueda ser sometido a estudio y análisis.
- *Modelo “determinista”*- designamos así al modelo que emplea valores puntuales (media, 95% percentil, etc.) para definir las variables.
- *Modelo no “determinista” (o “probabilística”)*- en este modelo las variables son descritas usando distribuciones de probabilidad.
- *Objetivo de rendimiento (OR)* – la máxima frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento, en un fase específica de la cadena alimentaria antes del momento de consumo, que proporcione o contribuya al logro de un FSO o un ALOP, según corresponda.
- *Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO)* - La máxima frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento en el momento de consumo que proporciona o contribuye a un nivel de protección adecuado.
- *Operación alimentaria* – una fase a lo largo de la cadena alimentaria donde el alimento se manipula o se prepara con un objetivo comercial.
- *“Output”*- Es la variable (cuantitativa o cualitativa) que se obtiene como resultado al aplicar un modelo.
- *Panel de expertos* – es un grupo de individuos que conjunto tienen formación y experiencia relativas a un peligro o un alimento y las condiciones que pueden provocar una enfermedad alimentaria, y que tienen la capacidad para asesorar basándose en la información científica disponible.
- *“Quórum sensing”* – es la capacidad de las bacterias para comunicarse y coordinar el comportamiento mediante señales moleculares.

- *Riesgo* - Una función de la probabilidad de que se produzca un efecto adverso para la salud y la gravedad de este efecto, consiguiente a uno o más peligros presentes en los alimentos.
- *Simulación* – es el proceso de imitar un sistema real mediante el empleo de un conjunto de fórmulas matemáticas.
- *Tasa o coeficiente de transferencia* – medida expresada en tanto por ciento del número de células transferidas de una superficie a otra durante un fenómeno de transferencia bacteria, o también llamado contaminación cruzada.
- *Validación* – es el proceso de obtención de pruebas para comprobar que los elementos del plan APPCC son eficaces.
- *Variabilidad* – Son las distintas formas o manifestaciones de un sistema físico. Es la variación inherente al sistema.

