

Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos

Universidad de Córdoba



**ANÁLISIS DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO:
LISTERIA MONOCYTOGENES EN ENSALADAS
DE IV GAMA**

TESIS DOCTORAL

Elena Carrasco Jiménez

Directores:

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

Córdoba, Marzo 2007

“Análisis del riesgo microbiológico: *Listeria monocytogenes* en ensaladas de IV gama”

Tesis que presenta la Licenciada Dña. Elena Carrasco Jiménez para optar al grado de Doctor

La Doctoranda

Fdo. Elena Carrasco Jiménez

VºBº

Los Directores

Prof. Dr Gonzalo Zurera Cosano Prof. 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 la Licenciada Dña. Elena Carrasco Jiménez con el título *“Análisis del riesgo microbiológico: Listeria monocytogenes en ensaladas de IV gama”* 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 21 de Febrero de 2007.

Prof. Dr Gonzalo Zurera Cosano

Prof. Dra. Rosa M^a García Gimeno

“Que dos y dos sean necesariamente cuatro, es una opinión que muchos compartimos. Pero si alguien sinceramente piensa otra cosa, que lo diga. Aquí no nos asombramos de nada”

(Antonio Machado)

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que estoy profundamente agradecida y a las que les corresponden un “trocito” de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, agradezco a mis directores de Tesis, el profesor Dr. D. Gonzalo Zurera y la profesora Dra. Dña. Rosa M^a García, todo el apoyo, guía y consejo que me han brindado durante el desarrollo de la Tesis.

Al profesor Dr. D. Gonzalo Zurera, por ser un modelo de perseverancia y madurez, y por su buen hacer en el trabajo diario.

A la profesora Dra. Dña. Rosa M^a García, por su talante luchador, voluntad, responsabilidad y capacidad de sacrificio.

A mis amigos “departamentales”: Fernandos, Pérez y Cámara, Antonio Valero, Rafa Ventura y Jose María Fuentes, por su apoyo en todo momento, por regalarme su alegría, su compañía, sus consejos y sus oídos para escuchar mis historias... Por esos “picos” vividos, que son tan irrepitibles como surrealistas, y que no han sido sino inyecciones de alegría. El “cuento” que hemos protagonizado es el que más me ha gustado de todos los que he leído (se lo contaré a mis nietos). Os quiero.

Al grupo de microbiología predictiva del Institute of Food Research (Norwich, UK), y muy especialmente al Dr. D. József Baranyi y al Dr. D. Yvan Le Marc, por dedicarme su tiempo y su apoyo constante durante estos años de tesis. Su ayuda ha sido inestimable, como también su acogida en Norwich, por lo que les estoy profundamente agradecida. Estoy en deuda con ellos. A mi compañera de estancia en Norwich, Elena Cosciani, mi “hermana” italiana, por su bondad y generosidad sin límite, y por los maravillosos momentos que vivimos juntas.

A todos mis compañeros de departamento, profesores, personal técnico y administrativo, por su afecto, cariño y ayuda en las rachas de “vorágine” laboratorial. Antonio Pino, Elena Galán, Paco Prados, Loli, Rosa Moreno, Juani, Jose Manuel, Rocío, Cati, Pati, Manu, Rafael, Paco, Luis, Salud, muchas gracias.

Como no, a mis amigos. Rocío, me faltan palabras para agradecerte tanto apoyo y cariño que me has dado. Nunca lo olvidaré. A mis chiquitas, M^a Cruz, Esterilla, Nieves, Sonia, Gloria, Isa, Irene, Piedad, Miriam, Amaya, Eli, que me regalan su alegría y su comprensión. Gracias por devolverme a mis

orígenes y desvariar de vez en cuando, tan necesario muchas veces. A mis chiquitos, Nacho, Antoine, Coki, Trigo, Sergi, Luigi, Carli, Tete, er Pérez, Pincho, Jesús, Juan, Pablo, Lobo, Pacone, Quino, Armando, Álvaro, incombustibles y con una capacidad natural de diversión que califico de sobrehumana, que hacen que me ría del mundo y de mí misma. A Rosa Valverde y Luz M^a Díaz, por su amistad desde mi llegada a Rabanales. A Rafa Delgado, por todo lo que he aprendido con él.

A mi madre, Pepita, y a mis hermanos, Susana, Rafa, Luis Alfonso y mi reciente hermano mayor, Antonio, a quienes adoro. Por su apoyo incondicional en todo momento, por su comprensión y cariño cada uno a su manera y por todo lo que me han dado. Por ellos, cualquier cosa. A la familia Vozmediano Gallego, y muy especialmente a Nacho, porque el paso de los años ha hecho darme cuenta de que son parte de mí, que son responsables de gran parte de lo que soy, y siempre los llevaré en mi corazón.

A todos aquellos que han hecho huella en mí a su paso por el departamento: mis francesas Elo y Auré, que tanto cariño me brindaron durante su estancia en Córdoba, Giovanni y Cristina, tan trabajadores y entusiastas, Rafa e Inma por su simpática colaboración.

Gracias a la Junta de Andalucía, que sin la beca que me fue concedida, esta Tesis probablemente no existiera.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

PREFACIO

La presente tesis se enmarca dentro de los proyectos de investigación CAL 01-032, AGL2001-2435 y AGL2005-0119, desarrollados en el seno del grupo de investigación AGR-170 Higiene Bromatológica (HIBRO) del Plan Andaluz de Investigación, adscrito a la Universidad de Córdoba. La temática de la tesis que se presenta, y en general la de los proyectos mencionados, se ha concebido y desarrollado como continuación de la trayectoria que nuestro grupo de investigación posee en el ámbito de la microbiología predictiva desde hace más de una década.

La petición y puesta en marcha de estos proyectos de investigación fue impulsada por la aparición de nuevas tendencias en materia de seguridad alimentaria, las cuales proponen el Análisis de Riesgos como base para la legislación alimentaria (Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 *por el que se establecen los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria*).

En España, el Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, *sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos* establece que la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) es la Autoridad responsable de evaluar los riesgos alimentarios (la Evaluación de Riesgos es un componente imprescindible del Análisis de Riesgos). Paralelamente, el Ministerio de Educación y Ciencia, dentro del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías agroalimentarias (Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2004-2007), apunta como prioritario la creación de un Centro de Competencia en Seguridad de los Alimentos (CECOC-SA) cuyos objetivos sean la Evaluación del Riesgo alimentario, respondiendo así a las demandas del comité científico de la AESAN. Estos hechos ponen de relevancia la necesidad de planificar y desarrollar actividades encaminadas a analizar los riesgos alimentarios.

Algunos países y organizaciones han llevado a cabo Evaluaciones de Riesgos de *Listeria monocytogenes* por consumo de varios alimentos, habitualmente, listos para consumo (WHO/FAO, 2004; U.S. Department of Agriculture, 2003). De hecho, una Evaluación global del Riesgo de *L. monocytogenes* en una población, implicaría el estudio detallado de todas las fuentes y vías de transmisión del microorganismo hasta el hospedador, lo que

conllevaría un tiempo y unos recursos materiales y humanos muy superiores a los disponibles para llevar a cabo una Tesis Doctoral. Así, por ejemplo, la transmisión vía alimentaria incluye la entrada potencial de *L. monocytogenes* en la cadena “de la granja a la mesa” a través del consumo de leche cruda, quesos frescos, carnes, pescado ahumado y ensaladas. Por lo expuesto anteriormente, la presente Tesis Doctoral aborda el Análisis de Riesgos de *L. monocytogenes* en un alimento concreta, las ensaladas de IV gama. Este trabajo constituye, pues, una propuesta y una primera aproximación al Análisis de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en España para una categoría de alimentos concreta. Los resultados obtenidos en la presente Tesis no sólo son importantes desde un punto de vista metodológico, sino que su consideración puede servir de gran ayuda en el estudio y desarrollo de políticas de gestión de *L. monocytogenes* para estos y otros productos listos para el consumo en España.

La listeriosis es una enfermedad alimentaria poco frecuente, pero de consecuencias graves. En España, la listeriosis aumentó en más de un 100% en el año 2004 en comparación con la media de los cinco años anteriores. Hasta la presente, no se han descrito brotes de listeriosis en España por consumo de ensaladas de IV gama, y los registros de casos de listeriosis del Sistema de Información Microbiológica no proporcionan información sobre la investigación epidemiológica llevada a cabo (vía de transmisión, alimento implicado en su caso, etc.). No obstante, la prevalencia de *L. monocytogenes* en vegetales y ensaladas, su amplia diseminación por el ambiente, difícil erradicación y su naturaleza psicrotrófica, hacen que industriales y autoridades sanitarias estén alerta sobre la posible presencia de *L. monocytogenes* en alimentos. Todo esto justifica la elección, en la presente Tesis Doctoral, de las ensaladas de IV gama como alimento potencialmente implicado en los casos de listeriosis en España.

La Tesis 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. Se estructura en siete secciones: (I) Resumen, (II) Aspectos conceptuales y metodológicos, (III) Objetivos, (IV) Publicaciones, (V) Discusión, (VI) Conclusiones y (VII) Referencias bibliográficas. Las secciones II, IV y V están subdivididas en capítulos correlativos, correspondiendo a la sección II los capítulos 1-3, a la sección IV los capítulos 4-7 y a la sección V los capítulos 8-10. A

continuación de este prefacio se presenta una lista con las abreviaturas empleadas en la Tesis, inclusive las de las publicaciones.

En la *Sección II. Aspectos conceptuales y metodológicos*, se desarrolla, por un lado, el Análisis de Riesgos (*Capítulo 1. Análisis de Riesgos*), y por otro lado, los tres pilares en los que se basa dicho Análisis, y en general, que inciden en la aparición de enfermedades alimentarias: patógeno, alimento y hospedador, tratándose estos aspectos en el *Capítulo 2. Listeria monocytogenes* y en el *Capítulo 3. Ensaladas de IV gama en España*.

En la *Sección III. Objetivos*, se exponen el objetivo general y los objetivos específicos que se propusieron en la presente Tesis.

En la *Sección IV. Publicaciones*, el orden de exposición de las publicaciones responde al transcurso de la normativa aplicable con respecto a la seguridad microbiológica de los alimentos a nivel nacional y comunitario. Durante muchos años, han sido los criterios microbiológicos la herramienta de gestión empleada por las autoridades sanitarias para incrementar la seguridad de los alimentos. Hasta ahora, el establecimiento de criterios microbiológicos se ha basado en la experiencia en la producción y procesado de alimentos, investigaciones y opiniones de expertos sobre la aplicación de *buenas prácticas de higiene*. El *Capítulo 4. Aplicación de modelos predictivos en alimentos de IV gama según la normativa vigente* trata la repercusión a nivel industrial de los criterios microbiológicos establecidos para *L. monocytogenes* en la categoría de alimentos en la que se engloban las ensaladas de IV gama (Reglamento (CE) N° 2073/2005). Sin embargo, actualmente, con el Reglamento (CE) N° 178/2002 y los nuevos documentos legislativos, se pretende que el Análisis de Riesgos sea la base para la legislación alimentaria. Del Análisis de Riesgos se derivarían opciones de gestión novedosas en el ámbito de la seguridad alimentaria, tales como los objetivos de seguridad alimentaria o los objetivos de rendimiento, pero también los criterios microbiológicos, basándose ahora su establecimiento en la Evaluación del Riesgo (elemento fundamental del Análisis de Riesgos). El *Capítulo 5. Crecimiento de Listeria monocytogenes en ensaladas de IV gama* y el *Capítulo 6. Recopilación de datos para la Evaluación de Riesgos microbiológicos en ensaladas de IV gama* son estudios preliminares y necesarios para llevar a cabo un Análisis de Riesgos de *L. monocytogenes* a través del consumo de estos productos en España, trabajo que se presenta en el capítulo 7, titulado *Análisis del Riesgo de Listeria monocytogenes en ensaladas de IV gama*. El capítulo 6, no obstante, proporciona información

válida, no sólo para abordar el riesgo de listeriosis, sino también cualquier otro riesgo derivado del consumo de ensaladas de IV gama.

La *Sección V. Discusión* incluye aquellos aspectos de relevancia surgidos de las publicaciones presentadas en la sección IV, estando organizada en los siguientes capítulos: *Capítulo 8. Aplicación de modelos de crecimiento en ensaladas de IV gama según la normativa vigente*, *Capítulo 9. Evaluación de la exposición de la población a Listeria monocytogenes*, y *Capítulo 10. Análisis del Riesgo de Listeria monocytogenes en ensaladas de IV gama*.

En la *Sección VI. Conclusiones*, se enumeran las conclusiones que se derivan de los estudios presentados a lo largo de la Tesis desde una perspectiva de seguridad alimentaria y de salud pública.

Por último, la *Sección VII. Referencias bibliográficas* recoge todas las referencias citadas en la Tesis doctoral, incluidas aquellas correspondientes a las publicaciones científicas.

La presente Tesis Doctoral constituye un avance en el desarrollo del Análisis del Riesgo Microbiológico, siendo su implantación en España aún incipiente. No sólo los resultados son valiosos para la Gestión del Riesgo de listeriosis por consumo de ensaladas de IV gama, sino que la propia metodología empleada puede constituirse como la base para el desarrollo de estudios de la misma naturaleza para otros patógenos.

¹ABREVIATURAS

- 1g, 2g, 3g-L_{pack}: Número de trozos contaminados de lechuga de 1, 2 y 3 gramos, respectivamente, en una bolsa de ensalada (*cap. 7*).
- AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (*cap. 3*).
- A_f (Accuracy factor): Factor exactitud (*cap. 4*).
- AFHORLA: Asociación Española de Frutas y Hortalizas lavadas, listas para su empleo (IV gama) (*cap. 3*).
- ALOP (Appropriate Level of Protection): Nivel Tolerable de Riesgo (*cap. 1*).
- APPCC: Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (*Contenidos*).
- ATCC (American Type Culture Collection): Colección americana de cultivos tipo (*cap. 5*).
- A_w (Activity water): Actividad de agua (*cap. 2*).
- b: Parámetro que determina la forma de la curva dosis-respuesta en el modelo Weibull-Gamma (2,14) (*cap. 7*).
- B_f (Bias factor): Factor sesgo (*cap. 4*).
- BHI (Brain Heart Infusion): Infusión cerebro corazón (*cap. 5*).
- BPH: Buenas Prácticas de Higiene (*Contenidos*).
- CAMP, test: Test Christie, Atkins, Munch, Petersen (*cap. 2*).
- CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (*cap. 5*).
- CFSAN (Center for Food Safety and Applied Nutrition): Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada (Estados Unidos) (*cap. 3*).
- CO, curva: Curva Característica de Operación (*cap. 1*).
- Cons: Número de consumidores de ensaladas de IV gama en España, con un perfil de consumo i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ raciones al año) (*cap. 7*).
- D: Dosis (ufc/serving) (*cap. 7*).
- DI₅₀: Dosis infectiva 50 (*cap. 1*).
- DNA (Deoxyribonucleic acid): Ácido desoxirribonucleico (*cap. 2*).

¹En cada abreviatura se detalla el capítulo en el que se nombra por primera vez. Las abreviaturas que comienzan por letras griegas se disponen al final de la lista de abreviaturas.

- EFSA (European Food Safety Agency): Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (*cap. 1*).
- ER: Evaluación del Riesgo (*Contenidos*).
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud (*cap. 1*).
- FEPEX: Federación Española de Asociaciones de Productores y Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas (*cap. 3*).
- FIFO (First In First Out): Primero en entrar es primero en salir (*cap. 3*).
- FSA (Food Standards Agency): Agencia de estándares de alimentos (Reino Unido) (*cap. 1*).
- FSO (Food Safety Objective): Objetivo de Seguridad Alimentaria (*Contenidos*).
- Grams 1g, 2g, 3g-L1: Número de gramos en un lote de los trozos contaminados de lechuga de 1, 2 y 3 gramos, después del lavado (*cap. 7*).
- Gr_{max} : Tasa máxima de crecimiento (\log_{10} ufc/h) (*cap. 5*).
- Ho : Nivel inicial del peligro en unidades logarítmicas (\log_{10}) (*cap. 1*).
- I : Incremento del peligro en unidades logarítmicas (\log_{10}) (*cap. 1*).
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods): Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (*cap. 1*).
- IFPA (International Fresh-cut Produce Association): Asociación Internacional de Productos Hortícolas de IV gama (*cap. 3*).
- ISO (International Organization for Standardization): Organización Internacional para la Estandarización (*cap. 2*).
- LAB (Lactic Acid Bacteria): Bacterias ácido-lácticas (*cap. 5*).
- LN: Logaritmo neperiano (*cap. 4*).
- Log_{inc} : Incremento del nivel de *L. monocytogenes* en unidades logarítmicas, a la temperatura recopilada de cada frigorífico monitorizado durante 24 h (*cap. 7*).

- MAP (Modified Atmosphere Packaging): Envasado en atmósfera modificada (*cap. 5*).
- MPD (Maximum Population Density): Máxima densidad de población (ln ufc/g) (*cap. 7*).
- MPRM (Modular Process Risk Model): Modelo de riesgo por procesos modulares (*cap. 1*).
- N: Concentración de células al final de la fase exponencial de crecimiento (ufc/g) (*cap. 4*).
- N₀: Concentración de células al comienzo de la fase exponencial de crecimiento (ufc/g) (*cap. 4*).
- NACMCF (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods): Comité asesor nacional de criterios microbiológicos en alimentos (Estados Unidos) (*cap. 1*).
- NCTC (National Collection of Types Cultures): Colección nacional de cultivos tipo (Reino Unido) (*cap. 5*).
- N_r: Concentración de células al final de la fase exponencial de crecimiento en la estapa considerada (ufc/g) (*cap. 7*).
- NFPA (National Food Processors Association): Asociación nacional de fabricantes de alimentos (Estados Unidos) (*cap. 3*).
- N_i: Concentración de células al comienzo de la fase exponencial de crecimiento en la estapa considerada (ufc/g) (*cap. 7*).
- N_{pack}: Concentración de *Listeria monocytogenes* en bolsas de ensalada de IV gama después del troceado de la lechuga en la industria (log₁₀ ufc/bolsa) (*cap. 7*).
- N_{pack-cons}: Concentración de *L. monocytogenes* en bolsas de ensalada de IV gama en el momento de consumo (log₁₀ ufc/bolsa) (*cap. 7*).
- N_{r-25g}: Concentración de *L. monocytogenes* en el producto fresco (log₁₀ ufc/25g) (*cap. 7*).
- N_{w-25g}: Concentración de *L. monocytogenes* en el producto lavado (log₁₀ ufc/25g) (*cap. 7*).
- N_{w-g}: Concentración de *L. monocytogenes* en el producto lavado (log₁₀ ufc/g) (*cap. 7*).

- OMC/MSF, acuerdo: Acuerdo de la Organización Mundial del Comercio/Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (*cap. 1*).
- OMS: Organización Mundial de la Salud (*cap. 1*).
- P: Probabilidad (*cap. 7*).
- P_a : Probabilidad de aceptación de un lote (*cap. 1*).
- PC (Performance Criterion): Criterio de rendimiento (*cap. 1*).
- P_c : Porcentaje de la población que consume ensaladas de lechuga de IV gama (*cap. 7*).
- PI (Probability of Illness): Probabilidad individual de enfermar por ración contaminada (*cap. 7*).
- PI_{aprox} : Aproximación normal a PI (*cap. 7*).
- PMA (Produce Marketing Association): Asociación para el comercio de productos agrícolas (Estados Unidos) (*cap. 3*).
- PMP (Pathogen Modeling Program): Programa de modelamiento de patógenos (*cap. 1*).
- PO (Performance Objective): Objetivo de rendimiento (*cap. 1*).
- Pop: Tamaño de la población española (de bajo o alto riesgo) (*cap. 7*).
- P_r : Probabilidad de rechazo de un lote (*cap. 1*).
- $Prev_0$: Prevalencia de *L. monocytogenes* en el producto fresco (fracción de unidad) (*cap. 7*).
- $Prev-M_{n10}$: Prevalencia definida por varias fuentes en las que el 95% de confianza es igual o mayor que el 95% de confianza de la variable $UPrev_{n10}$ para el mismo valor (*cap. 7*).
- $Prev-M_{n20}$: Prevalencia definida por varias fuentes en las que el 95% de confianza es igual o mayor que el 95% de confianza de la variable $UPrev_{n20}$ para el mismo valor (*cap. 7*).
- $Prev-M_{n30}$: Prevalencia definida por varias fuentes en las que el 95% de confianza es igual o mayor que el 95% de confianza de la variable $UPrev_{n30}$ para el mismo valor (*cap. 7*).
- $Prev_{\text{pack}}$: Prevalencia de *L. monocytogenes* en bolsas de ensalada (fracción de unidad) (*cap. 7*).

- QMRA (Quantitative Microbiological Risk Assessment): Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico (*cap. 7*).
- R: Reducción del peligro en unidades logarítmicas (\log_{10}) (*cap. 1*)/ Reducción de *L. monocytogenes* en el producto mediante lavado con cloro en unidades logarítmicas (\log_{10} ufc/25g) (*cap. 7*).
- RA (Risk Assessment): Evaluación del Riesgo (*cap. 7*).
- RM (Risk Management): Gestión del Riesgo (*cap. 7*).
- RTE (Ready-to-Eat): Listo para consumo (*cap. 5*).
- S1: Número de raciones consumidas por persona y año cuando la frecuencia de consumo es *ocasional* (*cap. 7*).
- S2: Número de raciones consumidas por persona y año cuando la frecuencia de consumo es *una o dos veces al mes* (*cap. 7*).
- S3: Número de raciones consumidas por persona y año cuando la frecuencia de consumo es *una o dos veces a la semana* (*cap. 7*).
- S4: Número de raciones consumidas por persona y año cuando la frecuencia de consumo es *más de dos veces a la semana* (*cap. 7*).
- SBDL (Safety-Based “use-by” Date Label): Etiquetas con fecha de caducidad basada en la seguridad (*cap. 6*).
- SCF (Scientific Committee on Food): Comité Científico de Alimentos (Comisión Europea) (*cap. 4*).
- $S_{cont; i}$: Número de raciones contaminadas consumidas por persona y año, con un perfil de consumo i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ raciones al año) (*cap. 7*).
- $S_{cont-Pop}$: Número de raciones contaminadas consumidas por la población española al año (*cap. 7*).
- $S_{cont-Pop; i}$: Número de raciones contaminadas consumidas por la población española al año, con un perfil de consumo i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ raciones al año) (*cap. 7*).
- SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health): Comité científico de medidas veterinarias relacionadas con la salud pública (Comisión Europea) (*cap. 2*).
- S_i : Número de raciones consumidas por persona y año ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ raciones al año) (*cap. 7*).

- SPS (Sanitary and Phytosanitary): Sanitaria y Fitosanitaria (*cap. 7*).
- SS (Serving Size): Tamaño de ración (*cap. 7*).
- SSSP (Seafood Spoilage and Safety Predictor): Indicador del deterioro y seguridad de los alimentos pesqueros (*cap. 1*).
- T: Temperatura (°C) (*cap. 7*).
- t: Tiempo durante la fase de crecimiento exponencial (h) (*cap. 4*).
- TBT (Technical Barriers to Trade): Barreras Técnicas al Comercio (*cap. 7*).
- T_{eff}: Temperatura estática “efectiva” (°C) (*cap. 7*).
- Temp_H = Temperatura de almacenamiento en frigoríficos domésticos (°C) (*cap. 7*).
- Temp_R = Temperatura de almacenamiento en puntos de venta (°C) (*cap. 7*).
- Temp_T = Cambio medio de temperatura durante el transporte desde el punto de venta hasta casa (°C) (*cap. 7*).
- Time_H = Tiempo de almacenamiento en frigoríficos domésticos (h) (*cap. 7*).
- time_R = Tiempo de almacenamiento en puntos de venta (h) (*cap. 7*).
- time_T = Tiempo de transporte desde el punto de venta hasta casa (h) (*cap. 7*).
- U.S. Food and Drug Administration: Departamento de Drogas y Alimentación de Estados Unidos (*cap. 1*).
- ufc/g: Unidades formadoras de colonia/gramo (*Resumen*).
- UFFVA (United Fresh Fruit and Vegetable Association): Asociación de frutas y vegetales unificados (*cap. 3*).
- UP_{PreV_{n10}}: Incertidumbre de la prevalencia de un lote que cumple el criterio microbiológico n=10 c=0, ausencia en 25 g (*cap. 7*).
- UP_{PreV_{n20}}: Incertidumbre de la prevalencia de un lote que cumple el criterio microbiológico n=20 c=0, ausencia en 25 g (*cap. 7*).
- UP_{PreV_{n30}}: Incertidumbre de la prevalencia de un lote que cumple el criterio microbiológico n=30 c=0, ausencia en 25 g (*cap. 7*).
- UP_{PreV_{source}}: Incertidumbre de la prevalencia encontrada en los trabajos cuya referencia se halla en la Tabla A6 del capítulo 7 (*cap. 7*).

- USDA (United States Department of Agriculture): Departamento de Agricultura de Estados Unidos (*cap. 7*).
- UVM (University of Vermont Medium): Medio de la Universidad de Vermont (*cap. 2*).
- W-G: Weibull-Gamma (*cap. 7*).
- WGA (Western Growers Association): Asociación de Agricultores del Oeste (Estados Unidos) (*cap. 3*).
- WTO (World Trade Organization): Organización Mundial del Comercio (*cap. 1*).
- X_{pack} : Número de gramos contaminados de producto terminado en una bolsa de ensalada (*cap. 7*).
- $X_{\text{r-l}}$: Número de gramos contaminados de producto fresco en un lote (*cap. 7*).
- $X_{\text{w-l}}$: Número de gramos contaminados de producto lavado en un lote (*cap. 7*).
- y_{end} : Asíntota superior de la curva sigmoidea de crecimiento (\log_{10} ufc/g) (*cap. 5*).
- y_{max} : Máxima concentración predicha para el máximo número de células o densidad máxima de población (\log_{10} ufc/g) (*cap. 5*).
- α : Parámetro de la distribución Gamma que describe la heterogeneidad patógeno-hospedador (0,25) (*cap. 7*).
- β : Parámetro de la distribución Gamma que describe la heterogeneidad patógeno-hospedador ($10^{15,26}$ ó $10^{10,98}$ para la población de bajo y alto riesgo, respectivamente) (*cap. 7*).
- λ : Fase de adaptación (días) (*cap. 5*).
- μ : Tasa máxima específica de crecimiento (\ln ufc/h) (*cap. 4*).
- μ_{max} : Tasa máxima específica de crecimiento (\ln ufc/h) (*cap. 5*) / Tasa máxima de crecimiento (\log_{10} ufc/h) (*cap. 7*).

CONTENIDOS

I. RESUMEN	1
II. ASPECTOS CONCEPTUALES Y METODOLÓGICOS	7
CAPÍTULO 1. ANÁLISIS DE RIESGOS	9
1.1. PRELIMINARES DEL ANÁLISIS DE RIESGOS	9
1.1.1. Riesgo y percepción del riesgo	9
1.1.2. Relevancia	10
1.1.3. Consideraciones generales.....	13
1.2. GESTIÓN DEL RIESGO	15
1.2.1. Antecedentes.....	15
1.2.2. Gestión de la seguridad microbiológica de los alimentos	17
1.2.2.1. Información epidemiológica	18
1.2.2.2. Evaluación del Riesgo (ER)	20
1.2.2.3. Establecimiento de un Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO)	20
1.2.2.4. Comprobación de que el FSO se consigue mediante un proceso previo o criterios de formulación del producto.	23
1.2.2.5. Establecimiento de los requisitos del proceso o del producto. ...	24
1.2.2.6. Implantación de medidas de control basadas en BPH y APPCC para controlar el proceso y el producto.	25
1.2.2.7. Establecimiento de criterios de aceptación.	27
1.2.2.8. Establecimiento de criterios microbiológicos para el producto final	29
1.3. EVALUACIÓN DEL RIESGO	38
1.3.1. Introducción.....	38
1.3.2. Identificación del peligro.....	38
1.3.3. Evaluación de la exposición.....	40
1.3.3.1. Microbiología predictiva	42
1.3.4. Caracterización del peligro.....	44
1.3.5. Caracterización del riesgo.....	45
1.3.6. Metodología de la Evaluación del Riesgo	47
1.3.6.1. Planteamiento del problema	47
1.3.6.2. Recopilación de datos	47
1.3.6.3. Descripción del sistema a través de modelos.....	49

1.3.6.4. Caracterización del riesgo y sus usos	52
1.3.6.5. Validación del modelo	55
1.3.7. Herramientas para la Evaluación del Riesgo.....	55
1.3.7.1. Esquemas cualitativos	55
1.3.7.2. Esquemas semi-cuantitativos.....	57
1.4. COMUNICACIÓN DEL RIESGO	59
CAPÍTULO 2. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>.....	63
2.1. INTRODUCCIÓN.....	63
2.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN	66
2.3. CARACTERÍSTICAS Y ECOLOGÍA	68
2.4. RESERVORIOS.....	72
2.4.1. Ambiente	72
2.4.2. Plantas de procesado de alimentos	72
2.4.3. Alimentos	73
2.4.4. Población humana.....	76
2.5. BROTES.....	78
2.6. ENFERMEDAD.....	82
2.6.1. Características de la enfermedad	82
2.6.2. Dosis infecciosa y patogenia	83
2.7. CONTROL	85
CAPÍTULO 3. ENSALADAS DE IV GAMA EN ESPAÑA	87
3.1. INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES.....	87
3.2. CLASIFICACIÓN LEGISLATIVA Y CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS	89
3.3. ESTADO ACTUAL DE LAS ENSALADAS DE IV GAMA EN ESPAÑA.....	92
3.4. SEGURIDAD DE LAS ENSALADAS DE IV GAMA “DE LA HUERTA A LA MESA”	97
3.4.1. Operaciones de producción y cosecha	99
3.4.2. Operaciones post-cosecha.....	101
3.4.3. Operaciones que añaden valor al producto/IV gama	102
3.4.4. Distribución.....	105
3.4.5. Consumidor, punto de venta y restauración.....	106

3.5. EVALUACIÓN Y GESTIÓN DEL RIESGO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN ENSALADAS DE IV GAMA	109
III. OBJETIVOS	111
IV. PUBLICACIONES.....	115
CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS EN ALIMENTOS DE IV GAMA SEGÚN LA NORMATIVA VIGENTE	117
QUANTITATIVE MODELS APPLICATION TO FULFIL MICROBIOLOGICAL CRITERIA IN FOODS.....	119
CAPÍTULO 5. CRECIMIENTO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN ENSALADAS DE IV GAMA	127
GROWTH OF <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ON READY-TO-EAT ICEBERG LETTUCE	129
CAPÍTULO 6. RECOPIACIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS EN ENSALADAS DE IV GAMA ..	149
SURVEY OF TEMPERATURE AND CONSUMPTION PATTERNS OF FRESH -CUT LEAFY GREEN SALADS: RISK FACTORS FOR LISTERIOSIS	151
CAPÍTULO 7. ANÁLISIS DEL RIESGO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN ENSALADAS DE IV GAMA	167
RISK ASSESSMENT AND MANAGEMENT OF <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> IN READY-TO-EAT SALADS.....	169
V. DISCUSIÓN	217
CAPÍTULO 8. APLICACIÓN DE MODELOS DE CRECIMIENTO EN ENSALADAS DE IV GAMA SEGÚN LA NORMATIVA VIGENTE	219
8.1. ELECCIÓN DEL MODELO DE CRECIMIENTO.....	222
8.2. CÁLCULO DEL NIVEL INICIAL DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	224
CAPÍTULO 9. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN DE LA POBLACIÓN A <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>.....	227
9.1. CRECIMIENTO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN ENSALADAS DE IV GAMA	228

9.2. RECOPIACIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN.....	231
CAPÍTULO 10. ANÁLISIS DEL RIESGO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN ENSALADAS DE IV GAMA	233
10.1. EVALUACIÓN DEL RIESGO E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES IMPLICADOS.....	233
10.2. GESTIÓN DEL RIESGO	237
VI. CONCLUSIONES	243
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	249

I. RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se analiza el riesgo alimentario de listeriosis por consumo de ensaladas de IV gama en la población española.

El Análisis de Riesgos constituye, en la actualidad, el marco en el que se debe basar la legislación alimentaria, con el objetivo de generar un nivel de protección de la salud y la vida de las personas (Reglamento (CE) N° 178/2002. *Artículo 6. Análisis del riesgo*).

Las ensaladas de IV gama constituyen un alimento que se halla en plena expansión, motivada por la rapidez y facilidad de preparación, así como por el valor nutritivo que de por sí poseen los vegetales, cuyo consumo se ha potenciado por las diferentes campañas de nutrición que se vienen desarrollando. Sin embargo, la seguridad de las ensaladas de IV gama puede verse comprometida por la presencia de patógenos como *Listeria monocytogenes*, cuya prevalencia tanto en vegetales crudos como en ensaladas de IV gama, sugiere que el tratamiento industrial de lavado no garantiza la ausencia del patógeno en el producto de IV gama. La listeriosis es una enfermedad poco frecuente (entre 2 y 7 casos por millón de habitantes), pero de consecuencias graves, con niveles de mortalidad excepcionalmente altos (20-40%) y que afecta principalmente a personas inmunodeprimidas, tales como personas que han sufrido trasplante de órganos, pacientes con SIDA, individuos infectados con HIV, mujeres embarazadas, pacientes con cáncer y ancianos.

Las ensaladas de IV gama, según el Reglamento (CE) N° 2073/2005 *relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*, se encuadra dentro de la categoría de «*alimentos listos para consumo que pueden favorecer el desarrollo de L. monocytogenes, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales*». Para esta categoría, el Reglamento establece dos criterios microbiológicos: (i) el nivel de *L. monocytogenes* debe ser <100 ufc/g durante la vida útil del producto, (ii) ausencia en 25 g de producto antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido. La aplicación del primer criterio depende de la demostración por parte del industrial de que no se excederá un nivel de 100 ufc/g de *L. monocytogenes* durante su vida comercial; en caso contrario, el criterio de elección sería el segundo. Esta demostración debe basarse en características físico-químicas del producto y en la consulta de literatura científica y, si es necesario, en modelos cuantitativos y/o experimentos de inoculación del patógeno en el producto. En la presente Tesis Doctoral se realizó una demostración basada en modelos

predictivos de crecimiento. Un modelo primario fue ajustado a datos de crecimiento del patógeno en endivias envasadas con atmósfera de CO₂. Paralelamente se aplicó un modelo secundario basado en datos de crecimiento en caldo de cultivo. Como era de esperar, los resultados derivados de la aplicación del modelo secundario fueron muy conservadores, excediéndose en todos los casos el límite 100 ufc/g a lo largo de la vida comercial. Sin embargo, con la aplicación del modelo primario, algunas de las condiciones de CO₂ y vida comercial permitieron que no se excediera el límite de 100 ufc/g. Son, por tanto, estas condiciones y este modelo los que el fabricante debería emplear si desea acogerse al criterio 100 ufc/g.

Una Evaluación del Riesgo que contemple las fases que tienen lugar “de la huerta a la mesa”, debe incluir las fases de almacenamiento y transporte por las que todo producto alimenticio atraviesa tras su fabricación hasta que es consumido. En el caso de las ensaladas de IV gama, estas fases se realizan en condiciones de refrigeración. Por ello, y dado que *L. monocytogenes* es un microorganismo psicrotrofo, se estudió el crecimiento del mismo en ensalada de lechuga de IV gama (representando a la mayoría de las ensaladas de IV gama comercializadas) a 13 y 5°C durante 14 días. Estas temperaturas representan, respectivamente, una temperatura de abuso y la temperatura normalmente recomendada por el fabricante y visible en la etiqueta del producto en la forma “Almacenar a 5°C”. Se obtuvieron tasas máximas de crecimiento de 0,019 y 0,013 log₁₀ ufc/h, respectivamente, siendo los incrementos microbianos, 5,85 y 2,66 log ufc/g, respectivamente. No se observó fase de adaptación a 13°C, al contrario de lo que ocurrió a 5°C, donde se observó una fase de adaptación muy prolongada (5,6 días). La composición inicial de gases fue: 4,65-6,2% CO₂, 2,1-4,3% O₂ y balance de N₂. Se estudió la capacidad predictiva de cinco modelos predictivos de *L. monocytogenes* disponibles en la literatura científica, observando que las predicciones de la tasa de crecimiento fueron conservadoras a 13°C, y mucho más cercanas a la tasa observada a 5°C. Esto último podría deberse al crecimiento similar de *L. monocytogenes* en caldo y en alimento bajo condiciones limitantes para el crecimiento, baja temperatura en este caso. Los efectos de la atmósfera modificada mencionada más arriba, en comparación con otros trabajos en los que no se empleó inyección inicial de gases en el producto, fueron: retraso del crecimiento de *L. monocytogenes* (mayor fase de adaptación y menor tasa de crecimiento) y aumento de la densidad máxima de población en el producto.

Un paso previo, pero no por ello desdeñable, a la Evaluación del Riesgo, es la recopilación de información. Por ello, se llevó a cabo una encuesta sobre

los hábitos de consumo de ensaladas de IV gama, y se monitorizó la temperatura de frigoríficos domésticos durante 24 horas. Hasta la fecha, no existe este tipo de información en España. Pese a que otros países y organismos han llevado a cabo este tipo de encuestas, idealmente se debe emplear información relativa al país objeto de estudio. Los resultados de esta encuesta son cruciales para llevar a cabo una evaluación de la exposición, dentro de la Evaluación del Riesgo. Los resultados de este estudio mostraron que el consumo de ensaladas de IV gama es moderado-bajo. El 24,3% de los encuestados no consumen ensaladas de IV gama; el restante 75,7% se atuvo a la siguiente distribución de frecuencias: 7,41% *más de dos veces a la semana*; 17,28% *una o dos veces a la semana*; 29,63% *una o dos veces al mes*, y 45,68% *ocasionalmente*. Las ventajas que los encuestados encuentran en las ensaladas de IV gama son *ahorro de tiempo y comodidad*. Por otra parte, se detectó que un 9,9% de los consumidores de estas ensaladas no siempre respeta la fecha de caducidad. En cuanto a las temperaturas de los frigoríficos domésticos, se encontró que la variabilidad de la media de temperaturas sigue una distribución Normal (6,62; 2,56), mientras que la variabilidad de la varianza fue descrita por la distribución Gamma (2,00; 1,00). Como era de esperar, los cambios de temperatura más importantes observados a lo largo de 24 h, se corresponden con los tiempos de día y de noche. Las temperaturas halladas en los frigoríficos domésticos son perfectamente compatibles con el crecimiento del patógeno, dada su naturaleza psicrotrofa.

Por último, se profundizó en el Análisis de Riesgos, y más concretamente, en la Evaluación y Gestión del Riesgo de listeriosis por consumo de ensaladas de IV gama. La Evaluación del Riesgo fue de tipo cuantitativo y estocástico, por lo que las variables consideradas se describieron mediante distribuciones de probabilidad, entendida esta como incertidumbre en algunos casos, y variabilidad en otros. La Evaluación del Riesgo se compone de cuatro fases: identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo. La evaluación de la exposición constituyó la parte más compleja, pues se modelaron la concentración y prevalencia de *L. monocytogenes* a lo largo de la cadena “de la huerta a la mesa”. Se escogió el modelo dosis-respuesta Weibull-Gamma para caracterizar *L. monocytogenes*. Con las distribuciones de probabilidad y el modelo dosis-respuesta empleados, se calculó el número de casos en la población de bajo y de alto riesgo para varios escenarios de prevalencia inicial del patógeno en lechuga (incertidumbre del modelo de Evaluación del Riesgo). Así, el número de casos varió entre 2×10^1 - 9×10^2 y 6×10^4 - 3×10^6 para

la población de bajo y de alto riesgo, respectivamente. La mediana de cada rango disminuyó hasta valores de 4×10^{-2} y 2×10^2 para las respectivas poblaciones, suponiendo el cumplimiento del criterio microbiológico ≤ 100 ufc/g a lo largo de la vida comercial del producto (Reglamento (CE) N° 2073/2005). Entre los inputs considerados en el análisis de sensibilidad, el *tamaño de ración* fue aquél para el que el output *-número de casos de listeriosis-* se mostró más sensible, en ambos tipos de población. En orden decreciente de sensibilidad, le siguieron los inputs *-temperatura de almacenamiento doméstico-*, *-tiempo de almacenamiento doméstico-* y *-nivel de L. monocytogenes en el momento de consumo-*. De las cuatro medidas de gestión analizadas, la inyección de gases durante el empaquetado de las ensaladas ($\text{CO}_2 \approx 5.5\%$, $\text{O}_2 \approx 3\%$ y balance de N_2) fue la más efectiva para la reducción del número de casos, seguido por un *almacenamiento doméstico en refrigeración = 4 días*, y una *disminución del consumo de ensaladas de IV gama por parte de la población de alto riesgo* (disminución del 50% de la probabilidad de consumo). Así como las enfermedades alimentarias, las medidas de gestión para reducir su incidencia conllevan también un gasto económico, por lo que será la autoridad competente la que deba sopesarlas y tomar decisiones al respecto.

La presente Tesis Doctoral supone una primera aproximación al Análisis de Riesgos en España, ilustrándolo con el patógeno *L. monocytogenes* en la categoría de alimentos *ensaladas de IV gama*. La información empleada para llevar a cabo la Evaluación y Gestión del Riesgo procede de la literatura, de trabajos incluidos en la presente tesis, y de datos demográficos de España. Idealmente, la Evaluación de Riesgos debe realizarse por un equipo multidisciplinar coordinado de estadísticos, epidemiólogos, sociólogos, médicos, microbiólogos de alimentos, etc., de forma que todas las áreas estén cubiertas. A menudo, se hace necesaria la cooperación por parte de la autoridad sanitaria para facilitar datos necesarios en las Evaluaciones del Riesgo. No obstante, la presente Tesis constituye un paso decisivo y una guía para futuros estudios que versen sobre el Análisis de Riesgos microbiológicos.

II. ASPECTOS CONCEPTUALES Y METODOLÓGICOS

CAPÍTULO 1. ANÁLISIS DE RIESGOS

1.1. PRELIMINARES DEL ANÁLISIS DE RIESGOS

1.1.1. RIESGO Y PERCEPCIÓN DEL RIESGO

La vida conlleva riesgos. Continuamente estamos encarando riesgos de uno u otro tipo. Algunas veces encaramos decisiones económicas arriesgadas; otras veces nos enfrentamos con peligros que atentan contra la vida. Aún más, no sólo nos enfrentamos con estos peligros, sino que diariamente tomamos decisiones sobre ellos y sopesamos, aunque sea de forma implícita, el riesgo y el beneficio. Cada mañana decidimos levantarnos, encarar el mundo y el trabajo, y privarse del beneficio de pasar un día en la cama, con el subsiguiente riesgo de ser despedido y el coste de la pérdida de salario. Decidimos cuándo es seguro cruzar la carretera, y cuándo es sabio esperar; decidimos usar las gafas de seguridad al trabajar con madera; o decidimos dejar de fumar (Wilson y Crouch, 2001).

El riesgo derivado de un determinado peligro adquiere diferentes dimensiones dependiendo del individuo; probablemente no se llegaría a consenso si los individuos de una población tuvieran que asignar un determinado valor al riesgo; un viejo aforismo dice que «la carne de un individuo es el veneno de otro». Además, estos valores no permanecerían constantes a lo largo del tiempo incluso tratándose del mismo individuo.

Dejando a un lado esta consideración, algunos riesgos se perciben como mayores que otros porque están muy bien documentados. Otros riesgos, aunque improbables, se refieren a catástrofes, por lo que la percepción del riesgo es desproporcional a su probabilidad real (p. ej., el riesgo de morir en un accidente de avión comparado con el riesgo de muerte atribuido al consumo de tabaco). Trautman (2001) incluyó en su trabajo sobre la comunicación del riesgo la Tabla 1.1 para ilustrar las características de la percepción del riesgo, asociadas a la mayor o menor aceptabilidad del riesgo por parte de los individuos.

En cuanto a los riesgos asociados a los alimentos, la Tabla 1.2 presenta un ejemplo de la discrepancia que existe entre la percepción de los riesgos por los consumidores y el riesgo real (estimado por expertos).

Tabla 1.1. Aceptabilidad el riesgo en función de las características de la percepción del riesgo. (Slovic, 1987).

Aceptabilidad del riesgo	
Más si:	Menos si:
Voluntario	Involuntario
Natural	Artificial
Familiar	No familiar
Justo	Injusto
Catastrófico	No catastrófico
Origen de confianza	Origen dudoso o no fiable
Buen proceso	Proceso pobre

Tabla 1.2. Clasificación de los riesgos para la seguridad alimentaria según la valoración de expertos (riesgo real) y según la percepción de los consumidores (riesgo percibido).

Riesgo real	Factor de riesgo	Riesgo percibido
Alto	Contaminación microbiana	Bajo
	Fallo en el empaquetado	
	Fallo en la distribución	
	Residuos de pesticidas	
	Biotechnología	
	Aditivos alimentarios	
Bajo	Radiación de los alimentos	Alto

Fuente: Hudson (1991)

1.1.2. RELEVANCIA

Previo a la exposición de la relevancia del Análisis de riesgos, se estima conveniente definir este concepto así como sus elementos. Así pues, el Reglamento (CE) N° 178/2002, *del Parlamento europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria*, establece en su Artículo 3 las siguientes definiciones, entre otras:

Análisis del Riesgo: proceso formado por tres elementos interrelacionados: Determinación del Riesgo, Gestión del Riesgo y Comunicación del riesgo.

Determinación del riesgo: proceso con fundamento científico formado por cuatro etapas: identificación del factor de peligro, caracterización del factor de peligro, determinación de la exposición y caracterización del riesgo.

En la mayoría de los documentos científicos en español, encontraremos Evaluación del Riesgo, en lugar de Determinación del Riesgo. Por lo tanto, será Evaluación del Riesgo el término empleado a lo largo de la presente Tesis. Por la misma razón, se sustituirá factor de peligro por peligro.

Gestión del riesgo: proceso, distinto del anterior, consistente en sopesar las alternativas políticas en consulta con las partes interesadas, teniendo en cuenta la Evaluación del Riesgo y otros factores pertinentes, y, si es necesario, seleccionando las opciones apropiadas de prevención y control.

Comunicación del riesgo: intercambio interactivo, a lo largo de todo el proceso de análisis del riesgo, de información y opiniones en relación con los factores de peligro y los riesgos, los factores relacionados con el riesgo y las percepciones del riesgo, que se establece entre los responsables de la Evaluación y los responsables de la Gestión del Riesgo, los consumidores, las empresas alimentarias y de piensos, la comunidad científica y otras partes interesadas; en ese intercambio está incluida la explicación de los resultados de la Evaluación del Riesgo y la motivación de las decisiones relacionadas con la Gestión del Riesgo.

La importancia del Análisis de Riesgos Microbiológicos en alimentos está progresivamente en aumento, plasmándose su relevancia en diferentes documentos legislativos. Ya en 1997, el Codex Alimentarius, en su documento *Principios para el establecimiento y aplicación de criterios microbiológicos en alimentos*, propuso como base para el establecimiento y aplicación de tales criterios «una necesidad definida, siempre y cuando su aplicación sea práctica. Tal necesidad se demuestra, por ejemplo, por la evidencia epidemiológica de que el alimento objeto de estudio pueda representar un riesgo para la salud pública y que el criterio sea significativo para la protección del consumidor, o como resultado de una Evaluación del Riesgo».

El Reglamento (CE) N° 178/2002 establece en su Artículo 6. Análisis del riesgo que:

1. Con el fin de lograr el objetivo general de un nivel elevado de protección de la salud y la vida de las personas, la legislación alimentaria se

basará en el Análisis del Riesgo, salvo que esto no convenga a las circunstancias o la naturaleza de la medida legislativa.

2. La Evaluación del Riesgo se basará en las pruebas científicas disponibles y se efectuará de una manera independiente, objetiva y transparente.

3. Con objeto de alcanzar los objetivos generales de la legislación alimentaria establecidos en el Artículo 5, la Gestión del Riesgo tendrá en cuenta los resultados de la Evaluación del Riesgo y, en particular, los dictámenes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria mencionada en el Artículo 22, el principio de cautela cuando sean pertinentes las condiciones mencionadas en el Apartado 1 del Artículo 7, así como otros factores relevantes para el tema de que se trate.

Siguiendo esta línea de justificación de la relevancia de la Evaluación de Riesgos, el Reglamento (CE) N° 852/2004, *de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios*, establece en su Artículo 13 la posibilidad de modificación y adaptación de lo dispuesto en dichos anexos, como consecuencia de «el asesoramiento científico y en particular nuevas evaluaciones de riesgos», entre otras causas.

Por otra parte, el Real Decreto 1940/2004, *de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos*, establece en el punto 1 del Artículo 4. Normas generales de vigilancia de las zoonosis y de los agentes zoonóticos que «las autoridades competentes recopilarán datos pertinentes y comparables para determinar y caracterizar peligros, evaluar la exposición a zoonosis y agentes zoonóticos y caracterizar los riesgos que entrañan», actividades encaminadas a realizar Evaluaciones de Riesgos Microbiológicos. En el caso de zoonosis transmitidas por alimentos destinados al consumo, la autoridad competente que se menciona es la Agencia Española de Seguridad Alimentaria en el ámbito de la Administración General del Estado. Por lo tanto, la temática de la presente tesis doctoral adquiere un interés primordial para la gestión de Riesgos Microbiológicos por parte de la Administración.

Además, la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (2003) dispone en el Tercer Plan Andaluz de Salud 2003-2008 como Objetivo 11 el «Reducir los riesgos para la salud asociados a los alimentos y al medio ambiente», proponiendo como estrategias en relación con los alimentos «Desarrollar el Sistema de Análisis de Riesgos como base de la política de seguridad alimentaria en Andalucía» y «Potenciar la gestión de riesgos alimentarios y su comunicación en la Administración local», entre otras.

1.1.3. CONSIDERACIONES GENERALES

El Codex alimentarius (1999) establece unas Consideraciones Generales con respecto al Análisis de Riesgos, que se exponen a continuación.

La separación funcional entre Evaluación y Gestión del Riesgo ayuda a garantizar la objetividad del proceso de Evaluación de Riesgos. Sin embargo, para un proceso completo y sistemático de Evaluación de Riesgos se precisan determinadas interacciones entre ambos. Estas pueden incluir una clasificación de los peligros así como decisiones sobre la política de Evaluación de Riesgos. Cuando en la Evaluación de Riesgos se toma en cuenta aspectos de Gestión del Riesgo, es necesario que el proceso de adopción de decisiones sea transparente; es el carácter transparente y objetivo lo que importa, y no quién es la persona encargada de la Evaluación o la Gestión.

Siempre que resulte práctico, se debe hacer lo posible por ofrecer un proceso de Evaluación de Riesgos que permita que las partes interesadas puedan aportar sus contribuciones. Dichas contribuciones mejoran la transparencia y aumentan la calidad de la Evaluación de Riesgos, y facilitan la Comunicación del Riesgo puesto que aumenta la credibilidad y aceptación de los resultados de la Evaluación de Riesgos.

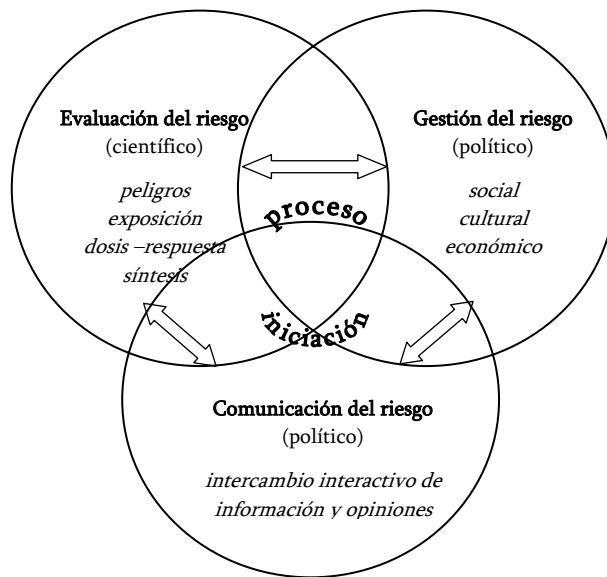


Figura 1.1. Representación esquemática de la interrelación entre Gestión del Riesgo, Comunicación del riesgo y Evaluación del Riesgo.

Ross y McMeekin (1995) propusieron un esquema (Figura 1.1) en el que se observa la interacción entre los tres elementos del Análisis del Riesgo (Evaluación, Gestión y Comunicación del Riesgo).

La Evaluación del Riesgo debe iniciarse en un punto, pero su desarrollo estará bajo el control de un gestor del riesgo que coordinará el proceso, dirigirá el intercambio de información, y transformará los resultados de la Evaluación en un plan de acción. La Figura 1.1 también muestra que el proceso de Análisis del Riesgo no es secuencial, sino interactivo e iterativo.

1.2. GESTIÓN DEL RIESGO

1.2.1. ANTECEDENTES

El Comité de Higiene Alimentaria del Codex Alimentarius pidió en 1995 a la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF) que escribiese un documento sobre la gestión de patógenos en alimentos en el comercio internacional. La ICMSF concluyó en 1996 que dicha gestión debería utilizar documentos que existían en el Codex y que deberían estar en la línea de los requisitos del Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio (Acuerdo OMC/MSF) (WTO, 1995), que establecía que los alimentos podrían importarse sin restricciones si no ponían en peligro el Nivel Adecuado de Protección para el consumidor en el país importador. En ese mismo acuerdo se identificaba la Evaluación del Riesgo (ER) como una herramienta para establecer si un alimento ponía o no en peligro el Nivel Adecuado de Protección, pero no abordaba cómo tendría que expresarse dicho nivel de protección, o cómo debería establecerse.

La ICMSF reconocía que sería difícil para la industria demostrar que un producto cumple el Nivel Adecuado de Protección de un país importador si ese nivel se expresa en términos como «el número de casos por 100,000 habitantes que provoca un determinado peligro en un alimento dado». Por otra parte, las herramientas del Codex para garantizar la seguridad del alimento eran: i) los sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) y Buenas Prácticas de Higiene (BPH), ambos recogidos en el documento del Codex *Principios Generales de Higiene de los Alimentos*, revisados por última vez en el año 2003 (Codex Alimentarius, 2003); y ii) los *Principios para Establecer y Aplicar Criterios Microbiológicos en Alimentos* (Codex Alimentarius, 1997).

En el sistema APPCC, los peligros se controlan eliminándolos del alimento o reduciéndolos hasta niveles aceptables. Pues bien, la Comisión del Codex Alimentarius entendía que tales niveles aceptables no pondrían en peligro el Nivel Adecuado de Protección. Sin embargo, mientras el Nivel Adecuado de Protección no se exprese como «el nivel de un peligro que sería aceptable en un alimento», la industria no sabría cuál es el nivel aceptable en el sistema APPCC. La ICMSF sintió así la necesidad de desarrollar el concepto de Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO), de acuerdo con el concepto de objetivos de calidad en los estándares de aseguramiento de calidad y de gestión de calidad (Jouve, 1992) y con la incorporación de los FSOs en un

sentido global (Jouve, 1996). Por aquel tiempo se había propuesto la misma terminología en distintos congresos para justificar el empleo de medidas sanitarias en el establecimiento de equivalencias entre países, y posteriormente apareció en publicaciones científicas (Hathaway, 1997; Hathaway y Cook, 1997).

La intención era que el FSO convirtiera el Nivel Adecuado de Protección en la máxima frecuencia y/o concentración de un peligro considerado como admisible para proteger al consumidor. El FSO se trasladaría a la industria alimentaria en forma de nivel y /o frecuencia que no se debe superar en un alimento en el momento del consumo a través de un procesado eficaz en la industria.

Se consideró que el resultado de una ER, al estar expresado en las mismas unidades que el Nivel Adecuado de Protección (p. ej., número estimado de casos al año), sería útil para establecer el FSO.

Así pues, en 1996 la ICMSF recomendó a la Secretaría del Codex seguir un método, constituido por fases, para la gestión de patógenos en alimentos. El primer paso sería llevar a cabo una Evaluación del Riesgo microbiológico: el segundo paso consistiría en desarrollar un FSO. El tercer paso debería confirmar que el FSO se puede lograr técnicamente aplicando sistemas APPCC y BPH. El cuarto consistiría en establecer los criterios microbiológicos cuando sea necesario, y el quinto paso sería establecer otros criterios de aceptación para alimentos en el comercio internacional. En 1997 se incorporó un paso adicional entre los pasos uno y dos, que consiste en la participación de distintos sectores de la sociedad (consumidores, industrias, etc.) para el establecimiento de un FSO.

Se ha debatido mucho sobre el papel de un FSO; algunos de los aspectos más controvertidos son: los FSOs no deben limitarse a convertir un Nivel Adecuado de Protección en un nivel de peligro en un alimento; en muchos casos, no se precisa una ER completa, sino que bastaría con un panel de expertos y una ER menos detallada; un FSO empleado en un país debe tratarse de forma totalmente independiente de los FSOs que se emplean para regular el comercio internacional de los alimentos.

La ICMSF recomienda que los gobiernos establezcan los FSOs para comunicar a las industrias el límite máximo de un peligro en un alimento.

1.2.2. GESTIÓN DE LA SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS

En la Figura 1.2 se describe con detalle una secuencia de actividades para establecer un sistema completo de seguridad alimentaria, siendo algunas de ellas competencia del gobierno, y otras, de la industria alimentaria.

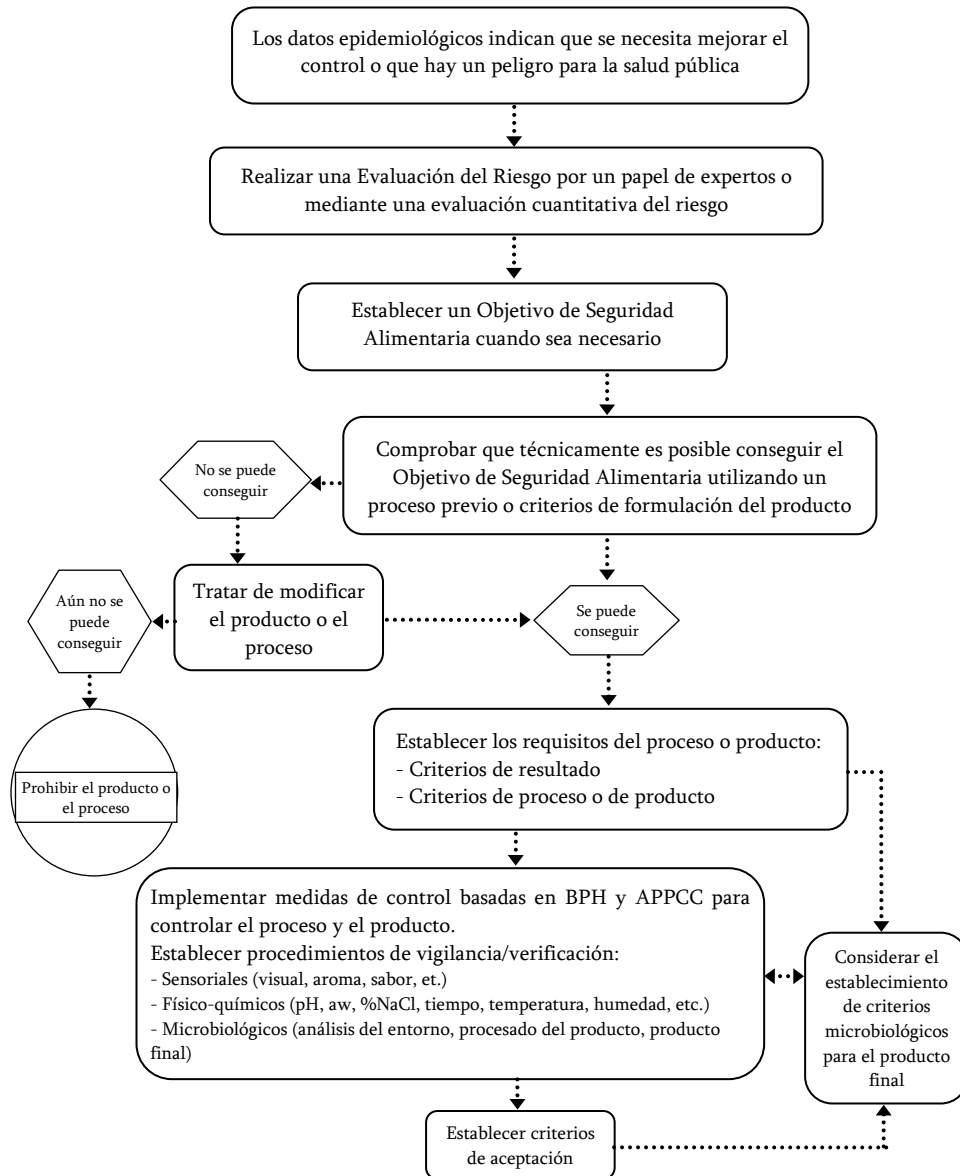


Figura 1.2. Esquema propuesto para gestión de la seguridad microbiológica de los alimentos (ICMSF, 2004).

A continuación se procede a la descripción de cada una de estas actividades. Conforme se vaya avanzado en la lectura, se irá descubriendo la terminología específica de la Gestión de Riesgos.

1.2.2.1. Información epidemiológica

La información epidemiológica es de crucial importancia para establecer la causa que origina una determinada enfermedad alimentaria, así como los factores implicados. Con la información epidemiológica, se espera concluir que existe un vínculo patógeno-alimento-hospedador. Como se verá más adelante, este paso constituye, a su vez, la primera parte en una ER, esto es, la identificación del peligro.

Esta información obtenida a lo largo de los años, también indica el efecto de las políticas adoptadas para evitar o reducir las enfermedades alimentarias.

Existen varios procedimientos que recogen información sobre la incidencia de las enfermedades alimentarias:

- Sistemas de notificación pasiva
- Sistemas de vigilancia activa
- Estudios de casos y controles
- Investigaciones de brotes
- Estudios centinela

Los sistemas de notificación pasiva recogen anualmente las incidencias de distintas enfermedades alimentarias. El sistema de notificación microbiológica del Centro Nacional de Epidemiología en España (<http://cne.isciii.es/>) sería un sistema de notificación pasiva.

Como ejemplo de sistemas de vigilancia activa, podríamos citar Enter-Net (http://www.hpa.org.uk/hpa/inter/enter-net_menu.htm) o FoodNet (<http://www.cdc.gov/foodnet/>). EnterNet fue creada para determinar con más precisión la incidencia de salmonelosis y de las infecciones causadas por *E. coli* O157 en Europa. Otro objetivo de EnterNet es identificar brotes en Europa a partir de alimentos con el mismo origen. El programa de vigilancia de los Estados Unidos, FoodNet, es un programa activo que recopila semanalmente las actualizaciones de informes de médicos en determinadas regiones del país referentes a gastroenteritis y listeriosis. Se comparan aislamientos de patógenos buscando características comunes para identificar brotes derivados de un mismo origen alimentario. Estos sistemas son relativamente nuevos y los datos comienzan a estar disponibles. En Europa, el programa de seguridad alimentaria de la oficina regional para Europa de la

OMS también posee un sistema de vigilancia disponible por Internet, además de otro tipo de información relevante para la salud pública (<http://www.euro.who.int/foodsafety>).

Con los estudios de casos y controles se intenta identificar las combinaciones patógeno-alimentos cuando es difícil aislar el microorganismo responsable del alimento, conocer factores de riesgo comunes en los pacientes sometidos a investigación, y además, conocer el papel de los alimentos en enfermedades con un periodo de incubación largo, como por ejemplo, la listeriosis. El estudio epidemiológico de los brotes, si se realiza adecuadamente, proporciona una información muy valiosa. Lamentablemente, no todos los brotes se investigan de forma apropiada o se describen completamente en la bibliografía. En algunas ocasiones, los casos esporádicos son más informativos que los brotes.

Los estudios centinela se basan en la vigilancia continua de determinadas incidencias sanitarias en un grupo de personas. Un ejemplo podría ser el estudio de diversos patógenos en muestras de heces de un grupo de pacientes con diarrea. Notermans y Hoofenboom-Verdegaal (1992) en Holanda y Wheeler y col. (1999) y FSA (2000) en Inglaterra, siguieron este procedimiento para estimar la incidencia de campylobacteriosis y salmonelosis.

Se ha destacado en numerosas conferencias internacionales el valor de los sistemas nacionales de información de enfermedades alimentarias, que muestran el panorama de los patrones de la enfermedad a nivel nacional. Se pretende que estos sistemas desemboquen en un sistema de cooperación internacional que facilite la transferencia de información y de experiencia, lo que ayudaría enormemente al establecimiento de Niveles Adecuados de Protección y FSOs, que se desarrollarán más adelante.

A nivel europeo, y según el *Artículo 33. Recopilación de datos* del Reglamento (CE) N° 178/2002, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es la Autoridad competente para recopilar información relacionada con i) el consumo de alimentos y exposición de individuos a riesgos relacionados con el consumo de alimentos; ii) incidencia y prevalencia de riesgos biológicos; iii) contaminantes en alimentos y piensos; y iv) residuos.

Cuando los datos epidemiológicos indiquen que se necesita una mejora en el control de una enfermedad o bien que hay un peligro para la salud pública que requiere consideración, los responsables de la Gestión de Riesgos

solicitarán una ER a los asesores oportunos, o bien reunirá a un grupo de expertos para que expongan sus juicios y recomendaciones.

1.2.2.2. Evaluación del Riesgo (ER)

Este apartado merece un tratamiento separado dado el volumen de conceptos y tareas que abarca. El subcapítulo 1.3 se dedicará por entero a la ER. No obstante, para un adecuado seguimiento del capítulo en el que nos situamos, se darán algunas pinceladas de los conceptos más importantes dentro de la ER.

La ER, definido anteriormente, es un ejercicio de recopilación y tratamiento de datos, fundamentalmente de índole epidemiológico, microbiológico, demográfico y de consumo, que resultará en una estimación del riesgo de contraer una determinada enfermedad alimentaria en una determinada población.

Por riesgo se entiende la ponderación de la probabilidad de un efecto perjudicial para la salud y de la gravedad de ese efecto, como consecuencia de un factor de peligro (Reglamento (CE) N° 178/2002). El riesgo se puede expresar de formas distintas, según sea requerido por los gestores del riesgo.

La ER bien pudiera ser cualitativa o cuantitativa. La evaluación cualitativa del riesgo está basada en datos que, a pesar de no constituir una base suficiente para cálculos numéricos del riesgo, permiten, si se cuenta con un conocimiento previo de expertos y una identificación de las incertidumbres que conllevan, establecer una clasificación de los riesgos según su gravedad o separarlos en categorías descriptivas de riesgo (Codex Alimentarius, 1999). La evaluación cuantitativa del riesgo ofrece expresiones numéricas del mismo, así como una indicación de la incertidumbre que conlleva (Codex Alimentarius, 1999).

El resultado de una ER será la base que sustente la decisión de los gestores del riesgo para establecer un determinado FSO. Además del resultado de una ER, los gestores del riesgo contarán también con las aportaciones de otros sectores interesados en seguridad alimentaria.

1.2.2.3. Establecimiento de un Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO)

Un Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO) se define formalmente como «la máxima frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento en el momento de consumo que proporciona o contribuye al nivel de protección

adecuado» (Codex Alimentarius, 2004). Un FSO tiene como objetivo traducir un nivel adecuado o tolerable de protección al consumidor en atributos medibles por la industria alimentaria para que esta implante medidas de control apropiadas.

Los FSOs son muy útiles para comparar metas en materia de seguridad de diferentes países o de empresas relacionadas, y pueden servir para determinar la equivalencia de medidas de control para la protección de la salud que parezcan diferentes, pero que en realidad puedan ser equivalentes.

Pero, ¿cuál es el nivel adecuado o tolerable de protección al consumidor? Idealmente, lo deseable sería eliminar por completo un peligro del alimento durante las etapas de producción primaria, transformación, distribución, e incluso preparación doméstica previa al consumo. En este punto, nos encontramos con el siguiente escollo: el riesgo 0 no existe. Por tanto, se ha de determinar un riesgo tolerable, teniendo en cuenta consideraciones de salud pública, de tipo económico, la aceptación del consumidor, etc.

Respecto al concepto *Nivel Tolerable de Protección al consumidor*, el Acuerdo OMC/MSF (WTO, 1995) le asigna la denominación *Nivel Adecuado de Protección Sanitaria o Fitosanitaria*, y la define como «el nivel de protección que se considera apropiado por un país miembro mediante el establecimiento de una medida sanitaria o fitosanitaria para proteger la vida o la salud humana, animal o vegetal en su territorio». El Acuerdo afirma que «muchos miembros se refieren a este concepto como el nivel aceptable de riesgo». La ICMSF prefiere el término *Nivel Tolerable de Riesgo (ALOP)* en lugar de *Nivel Aceptable de Riesgo*, defendiendo que los riesgos relacionados con el consumo de alimentos rara vez se aceptan, sino que más bien se toleran.

Como se ha dicho anteriormente, en la determinación de un ALOP entran muchas consideraciones de índole económica, social, política, etc. Esto, dicho de forma tan escueta, es de muy difícil aplicación, y varía enormemente entre países. Cuando se determina que una opción de gestión es óptima, una pregunta clave es «para quién es óptima» y «cuáles son los criterios empleados para su determinación». Como ejemplo hipotético (Buchanan, 2002), consideremos que se necesita conseguir una reducción de patógenos en la superficie de cierto tipo de cítricos. En un país industrializado donde los costes de mano de obra son altos, el uso de tecnología de pasterización de la superficie del producto por vapor de alta velocidad podría ser un sistema óptimo para conseguir la reducción deseada. Sin embargo, en

un país en vías de desarrollo donde los costes de mano de obra son bajos pero los costes del capital son altos, podría ser más adecuado lavar la fruta a mano en una solución desinfectante apropiada. Por tanto, si el criterio es mínimo coste de mano de obra y rapidez, entonces la primera opción es la óptima, mientras que si el criterio es mínima inversión de capital y máximo empleo, la segunda opción sería la óptima. “El «óptimo», como la belleza, está en los ojos del que mira”.

Una vez determinado un ALOP, se puede estimar el FSO con la ayuda de la información proporcionada por una ER; se ha de tener en cuenta que tanto los resultados de una ER como el ALOP se expresan en los mismos términos de riesgo. Sin embargo, no se ha de olvidar que también es posible fijar un FSO sin haber fijado previamente un ALOP concreto, p. ej. en los casos en los que no se dispone de datos cuantitativos resultado de una ER cuantitativa. Se ha de pensar en lo que se ha hecho hasta ahora; los criterios, recomendaciones y especificaciones microbiológicas no son otra cosa que concentraciones máximas de patógenos en alimentos que se han establecido con el único propósito de proteger la salud del consumidor, y ha sido el conocimiento de las enfermedades alimentarias y su epidemiología, de los alimentos implicados y las operaciones industriales, lo que ha permitido su establecimiento. FSO y criterio microbiológico son conceptos distintos que se tratarán más adelante. Desde siempre se ha tenido que tomar decisiones con respecto a la seguridad de los alimentos, sólo que ahora, dentro del marco del Análisis de Riesgos, estas decisiones se apoyarán en datos científicos y objetivos, y cuyas consecuencias son previsibles y cuantificables.

La Figura 1.3 ilustra el riesgo que implicaría la implantación de distintas estrategias de gestión. Sólo los escenarios B y C dan lugar a riesgos que no superan el FSO establecido.

Se pone de manifiesto que los FSOs podrían variar considerablemente entre países, puesto que son reflejo de las condiciones de comercialización, hábitos alimentarios, de preparación y de utilización. Sin embargo, un país no puede exigir que los alimentos importados sean «más seguros» que los alimentos similares que se obtienen a nivel nacional. Así, los FSOs proporcionan un medio para implementar el concepto de equivalencia en el Artículo 4.1 del Acuerdo OMC/MSF (WTO, 1995): «Los países miembros aceptarán las medidas sanitarias y fitosanitarias de otros miembros como equivalentes,...., si el país exportador demuestra objetivamente... que sus

medidas logran el Nivel Adecuado de Protección sanitaria o fitosanitaria del país importador».

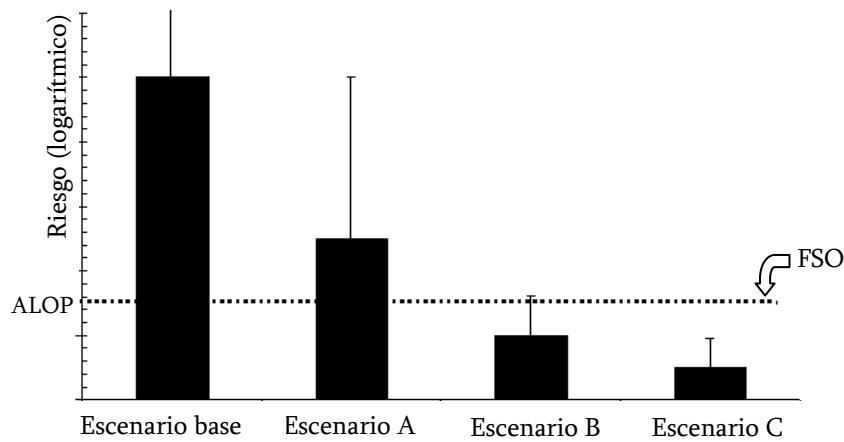


Figura 1.3. Comparación del riesgo asociado con diferentes escenarios, cada uno representando una estrategia de gestión; se incluye el percentil 95 (barras) de la estimación del riesgo. La línea punteada representa al Nivel Tolerable de Riesgo (ALOP) correspondiente a un FSO. Adaptado de FAO/WHO (2002).

Por otra parte, un FSO es también útil cuando se evalúa la seguridad de nuevos productos. Para lanzar nuevos productos o nuevos alimentos al mercado, su seguridad debe equivaler sustancialmente a la existente para productos similares.

1.2.2.4. Comprobación de que el FSO se consigue mediante un proceso previo o criterios de formulación del producto.

Cuando se comprueba que un determinado alimento es producido y comercializado (bajo un sistema APPCC y BPH) de tal forma que no sobrepasa el FSO establecido, entonces se conoce empíricamente que el proceso «funciona» desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. En caso de que sobrepase el FSO, se tratará de modificar el proceso o el producto; si no fuera viable técnicamente tal modificación, podría ser necesario prohibir el producto o el proceso.

El sistema APPCC es un documento que aborda de forma sistemática la identificación, evaluación y control de los peligros para la seguridad alimentaria de un alimento concreto en un proceso concreto. Es un sistema dinámico que se nutre de registros. La descripción detallada de este sistema

así como de las BPH se puede consultar en el Codex Alimentarius (2003). Al igual que el sistema APPCC, las BPH constituyen un ejercicio dinámico, que se nutre de los registros de ejecución, vigilancia y acciones correctoras, y verificación.

En España, tanto el sistema APPCC como las BPH se engloban dentro del denominado Sistema de Autocontrol; las BPH se desglosan en Planes Generales de Higiene. Tanto el sistema APPCC como las BPH son de obligado cumplimiento en el ámbito europeo, y prácticamente una condición previa en el comercio mundial de alimentos.

La Junta de Andalucía proporciona un documento orientativo de especificaciones de sistemas de autocontrol (Ameyugo y col., 2003).

1.2.2.5. Establecimiento de los requisitos del proceso o del producto.

Una vez se conoce que los procesos a los que se somete el producto así como la formulación del mismo llevan a la consecución de un FSO, el siguiente paso sería añadir información cuantitativa a los procesos y/o al producto mediante:

- Objetivo de rendimiento (*Performance Objective*; PO): máxima frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento en una etapa específica a lo largo de la cadena de producción primaria, transformación, distribución y preparación previa al consumo, que proporciona o contribuye a la consecución de un FSO o un ALOP, según sea aplicable (Codex Alimentarius, 2004).

- Criterio de rendimiento (*Performance Criterion*; PC): el efecto sobre la frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento que se debe conseguir mediante la aplicación de una o más *medidas de control* para dar lugar o contribuir a la consecución de un PO o un FSO (Codex Alimentarius, 2004). Las citadas medidas de control se desarrollarán en el siguiente subapartado. Un criterio de resultado podría ser una reducción de 6 D de *Listeria monocytogenes* en alimentos refrigerados listos para el consumo (Lund y col., 1989), o una reducción de 5 D de *Escherichia coli* O157:H7 para productos cárnicos fermentados (Nickelson y col., 1996), ambas reducciones referidas a todas las fases que abarca la cadena “de la granja a la mesa”.

Dada la relación existente entre este último concepto y el FSO, la ICMSF (2004) propone una inecuación:

$$H_0 - \sum R + \sum I \leq \text{FSO}$$

donde FSO es el Objetivo de Seguridad Alimentaria; H_0 , el nivel inicial del peligro; $\sum R$, la reducción total (acumulada) del peligro; y $\sum I$, el incremento total (acumulado) del peligro. Todos los términos de la inequación se expresan en unidades logarítmicas (\log_{10}).

Bien $\sum R$, o bien R_i (dado $\sum R = \sum_{i=1}^n R_i$), constituyen criterios de resultado. Estos criterios se deben gestionar adecuadamente para resultar como máximo en el FSO establecido. Esta gestión se lleva a cabo mediante criterios de proceso y de producto, los cuales se describen a continuación:

- Criterios de proceso: son parámetros de control (p. ej., tiempo, temperatura, presión) que pueden aplicarse en una fase o conjunto de fases para conseguir un criterio de resultado. Por ejemplo, según la U.S. Food and Drug Administration (1997), la aplicación de una temperatura de 71,7°C durante 15 s para la pasteurización de la leche.

- Criterios de producto: son parámetros del alimento que aseguran que el nivel de un peligro no aumenta hasta niveles inaceptables antes de la preparación culinaria o del consumo. También pueden evaluarse para evaluar la aceptabilidad de un alimento. Por ejemplo, que un pH de un alimento sea de 4.6 o inferior, o que posea una a_w de 0,86 o inferior.

- Criterios por defecto: son valores conservadores que se establecen para garantizar la seguridad de un proceso o de un alimento. Se deben aplicar criterios por defecto si no se cuenta con recursos suficientes para realizar la investigación necesaria para desarrollar criterios de proceso o de producto. Por lo general, son las autoridades responsables del control o comités asesores los que establezcan estos criterios.

Esta terminología, aunque novedosa, guarda estrecha relación con los conceptos del sistema APPCC. Así, los criterios del proceso y producto podrían ser los límites críticos del sistema APPCC. Sin embargo, los criterios del proceso y producto, así como los objetivos de resultado tienen un objetivo común tangible, que es la no superación de un FSO.

1.2.2.6. Implantación de medidas de control basadas en BPH y APPCC para controlar el proceso y el producto.

Se necesita la implantación de medidas de control para conseguir los criterios definidos en el apartado anterior. Las *medidas de control* se definen como las acciones y actividades que se realizan para evitar, eliminar o reducir

un peligro para la seguridad alimentaria hasta un nivel tolerable (ICMSF, 2004). Generalmente se clasifican en tres categorías:

(i) Controlar los niveles iniciales: evitando alimentos con antecedentes de contaminación o toxicidad (p. ej., leche cruda); seleccionando los ingredientes (p. ej., huevo líquido o leche pasteurizados); utilizando los análisis y los criterios microbiológicos para rechazar ingredientes o productos inaceptables.

(ii) Evitar el incremento de los niveles: evitando la contaminación (p. ej., evitando contaminación cruzada en la industria, usando técnicas de envasado aséptico; programas de educación para los manipuladores); evitando la proliferación de patógenos (p. ej., refrigeración, congelación).

(iii) Reducir los niveles: destruyendo los patógenos (p. ej., congelando el alimento para destruir algunos parásitos, empleando desinfectantes, pasterización, irradiación); reduciendo el nivel de patógenos (p. ej., lavado, ultrafiltración, centrifugación).

Todas estas medidas están contempladas en el sistema APPCC o en las BPH, así como su vigilancia y verificación.

En la Figura 1.4 se presenta un esquema en el que se plasman muchos de los conceptos expuestos hasta ahora; se observa la relación existente entre

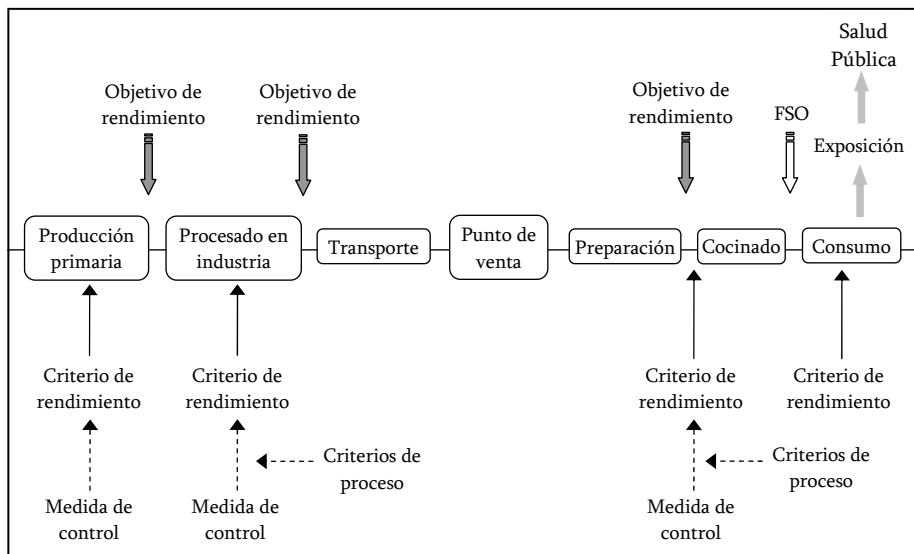


Figura 1.4. Representación esquemática de las relaciones entre la guía dada a nivel gubernamental y las medidas tomadas a nivel industrial en determinados puntos de una cadena hipotética “de la granja a la mesa” de un alimento (Gorris, 2005).

dichos conceptos y su ubicación en varios puntos de una cadena hipotética “de la granja a la mesa” de un alimento. Los objetivos de rendimiento y los FSOs deben estar incluidos en guías gubernamentales, mientras que a nivel industrial, son las medidas de control y los criterios de rendimiento y de proceso (recogidos en el sistema de autocontrol) los mecanismos que se aplican para cumplir lo estipulado en dichas guías.

1.2.2.7. Establecimiento de criterios de aceptación.

En cada etapa de la cadena “de la huerta a la mesa” donde tiene lugar transferencia de un producto, hay normalmente un proveedor y un comprador. Los compradores y los proveedores pueden proceder bien de la Administración o bien de la industria. Los proveedores pueden ser nacionales o de otro país. En estas transferencias, el comprador acepta el producto del vendedor. Pero, ¿en base a qué se acepta el producto?.

La aceptabilidad de lotes o partidas individuales de alimentos se establecen mediante criterios. Estos criterios bien pudieran ser de tipo sensorial, químico, físico o microbiológico. Los criterios de aceptación deben incluir información adicional como es el número de muestras que debe analizarse, cómo y cuándo se toman y se conservan hasta su análisis, la unidad analítica, el método de análisis y qué se considera aceptable. Los criterios de aceptación se clasifican generalmente en tres categorías:

- Estándar o norma: un criterio obligatorio que forma parte de una ley u ordenanza.
- Directriz: un criterio aconsejado por la autoridad responsable del control, una asociación de industrias o un fabricante de alimentos, para indicar el resultado que se esperaría si se siguen unas buenas prácticas.
- Especificación: parte de un acuerdo de compra entre un comprador y un proveedor de un alimento; este criterio puede ser obligatorio o sólo una recomendación, según su uso.

Cuando se trata de comercio internacional, se necesita desarrollar un mecanismo de aceptación basado en el acuerdo mutuo entre las autoridades de los países que intervienen. La premisa para que un país exportador exporte alimentos a un país importador es que ofrezca un nivel equivalente de protección al consumidor, es decir, el mismo ALOP. El concepto de equivalencia se introdujo en el Acuerdo OMC/MSF (WTO, 1995). Según este Acuerdo, cada país miembro de la OMC tiene que aceptar los sistemas de

control de alimentos de otros países miembros como equivalentes a los suyos, mientras ofrezcan el mismo ALOP. Un sistema de control de alimentos abarca una serie de medidas sanitarias que se pueden clasificar como:

- Infraestructura, incluyendo la base legislativa (p. ej., la legislación alimentaria y su aplicación), y los sistemas administrativos (p. ej., la organización de la autoridad a nivel nacional y regional).

- Diseño/implantación de programas, incluyendo la documentación de los sistemas, ejecución, criterios de decisión y actuación, capacidad del laboratorio y recursos para certificación y auditoría.

- Requisitos específicos, incluyendo los medios (p. ej., diseño de locales), equipos (p. ej., diseño de los aparatos en contacto con los alimentos), procesos (p. ej., calentamiento a presión, planes APPCC), procedimientos (p. ej., inspección *post mortem*) y análisis (p. ej., análisis de peligros microbiológicos y químicos).

La forma preferible de gestionar la seguridad del alimento consiste en seleccionar proveedores en quienes se pueda confiar y que siempre suministren ingredientes o alimentos que cumplan las exigencias de seguridad

Tabla 1.3. Parámetros que se pueden utilizar para determinar la aceptabilidad de un proveedor.

Componente del sistema de control de alimentos	Expectativa
BPH	Se aplican y están diseñadas para ayudar a controlar los peligros conocidos
Sistema APPCC	Se aplica y está diseñado para controlar los peligros significativos
FSO	El proceso se ha diseñado y validado para cumplir un FSO
Criterios de rendimiento	Procesos validados
Criterios del proceso	Criterios del proceso incorporados como límites críticos del sistema APPCC
Criterios del producto: especificaciones organolépticas, químicas, físicas y biológicas	Se cumplen las especificaciones
Registros	Los registros son completos, precisos y facilitan la validación y la verificación

alimentaria. Los sistemas de seguridad alimentaria basados en la prevención resultan mucho más eficaces que intentar distinguir mediante análisis microbiológico los lotes seguros de los que no lo son. Aunque puede tener sentido analizar determinados ingredientes o alimentos, el análisis microbiológico debe aplicarse con cautela y utilizarse para completar otra información, en particular referente a las condiciones en las que se obtiene el producto. La Tabla 1.3 ofrece una relación de parámetros que se puede utilizar para aprobar proveedores.

Mediante auditoría se comprueba si son aceptables las condiciones de producción de ingredientes o de alimentos. La ICMSF (2004) proporciona una guía para llevar a cabo una auditoría con el objetivo de aceptar un proveedor.

1.2.2.8. Establecimiento de criterios microbiológicos para el producto final

El FSO, pese a que es la herramienta de elección para diseñar y controlar las operaciones de la industria alimentaria, no tiene como finalidad comprobar la aceptación de un lote. Sin embargo, un FSO se puede utilizar como base para establecer criterios microbiológicos. Es más, es muy importante que los criterios microbiológicos sean compatibles con el FSO de un alimento en un sistema de producción concreto. Aunque a primera vista ambos conceptos son similares, difieren notablemente tanto en función como en contenidos (ICMSF, 2004; Stringer, 2005).

Según Codex Alimentarius (1997), «un criterio microbiológico en alimentos define la aceptabilidad de un producto o un lote de producto, basado en la ausencia o presencia, o en el número de microorganismos incluyendo parásitos y/o cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, área o lote».

Se debe establecer y aplicar un criterio microbiológico sólo cuando existe una necesidad concreta y su aplicación es práctica. Tal necesidad se demuestra: i) por evidencias epidemiológicas de que el alimento en cuestión representa un riesgo para la salud pública y que un determinado criterio es de suma importancia para la protección del consumidor, o ii) como resultado de una ER.

Recientemente se han establecido a nivel comunitario los criterios microbiológicos en alimentos mediante el Reglamento (CE) N° 2073/2005, *de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*.

Si bien no se considera oportuno entrar en detalle sobre todos los aspectos que comportan los criterios microbiológicos, pues no es el objetivo de la presente Tesis, sí que se estima conveniente abordar uno de los componentes de los criterios microbiológicos, que, por su carácter estocástico, guarda una estrecha relación con los FSOs; esto es, los planes de muestreo.

Desde el punto de vista de seguridad alimentaria, ICMSF (2004) distingue entre 15 casos de alimentos, basándose esta distinción en las condiciones en las que el alimento se manipula y consume en condiciones habituales, y en el tipo de alimento de que se trate y los peligros que comporte. Cada caso requiere un determinado plan de muestreo, en orden creciente de restricción según se avanza desde el caso 1 hasta el 15, como se puede ver en la Tabla 1.4.

Se usan dos tipos generales de planes de muestreo para tomar decisiones en relación con la seguridad o calidad de los alimentos: planes de atributos y planes de variables. Los primeros se usan para evaluar datos cualitativos (presencia-ausencia) o datos cuantitativos agrupados (p. ej., <10 ufc/g, 10-100 ufc/g; >100 ufc/g), mientras que los segundos evalúan datos cuantitativos no agrupados. Sin embargo, a pesar de su uso extendido, los criterios microbiológicos y los planes de muestreo no se entienden completamente, especialmente su trasfondo estadístico y su relación con otras herramientas de Gestión del Riesgo como el APPCC o los FSOs (Dahms, 2004).

Tabla 1.4. Severidad de plan (caso) en relación con el grado de riesgo y las condiciones de uso.

Tipo de peligro	Condiciones normales esperables de manipulación y consumo del alimento tras el muestreo		
	Reducen el riesgo	Riesgo sin cambios	Pueden incrementar el riesgo
Utilidad (p. ej. contaminación general, disminución de la vida útil, alteración)	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Indicadores; peligro escaso e indirecto	Caso 4	Caso 5	Caso 6
Peligro moderado, no suele peligrar la vida, no suelen quedar secuelas, de corta duración, los síntomas no son limitantes, puede causar molestias importantes	Caso 7	Caso 8	Caso 9
Peligro serio, que produce incapacidad, no suele peligrar la vida, secuelas esporádicas, duración moderada	Caso 10	Caso 11	Caso 12
Peligro grave para (a) la población en general o (b) grupos determinados, pone en peligro la vida o causa secuelas crónicas o un proceso de larga duración	Caso 13	Caso 14	Caso 15

Los planes de muestreo de atributos se subdividen clásicamente en planes de atributos de 2 clases y de 3 clases. En los primeros, la calidad se divide en “aceptable” y “no aceptable”; en los segundos, la calidad se divide en “aceptable”, “marginamente aceptable” y “no aceptable”.

En un plan de atributos de 2 clases, el proceso de toma de decisiones se define esencialmente por dos números: n , número de muestras que se han de escoger independientemente y al azar; y c , número máximo de muestras que se permite que sean insatisfactorias. En el caso de planes de 2 clases aplicados a datos cuantitativos, hay 1 sólo límite microbiológico, denominado m , que discrimina la calidad no aceptable de la buena calidad; en este caso, c sería el número máximo de muestras que puedan exceder este límite.

Para visualizar y estudiar el resultado de un plan de muestreo, se emplea la curva característica de operación (curva CO) de dicho plan. Para un plan de 2 clases, el eje de abscisas representa la fracción de unidades defectuosas del lote, mientras que el eje de ordenadas da la probabilidad de aceptación (P_a) de un lote. La Figura 1.5 muestra la curva CO de un plan de 2 clases:

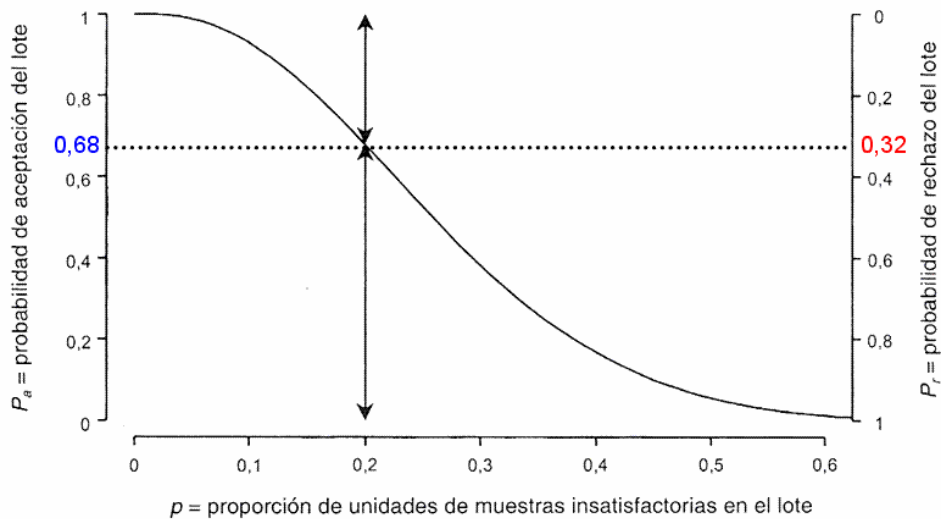


Figura 1.5. Curva característica de operación (CO) para un plan de muestreo de 2 clases con $n = 10$ y $c = 2$; en esta curva, si el lote contiene un 20% ($p = 0,20$) de muestras insatisfactorias, este se aceptará con una probabilidad de 0,68 y se rechazará con una probabilidad de 0,32.

De la Figura 1.5 se deduce que, moviéndonos a lo largo del eje de abscisas, cualquier proporción defectuosa que contenga un lote, siempre conlleva una cierta probabilidad de aceptarlo (denominada riesgo del consumidor), así como una determinada probabilidad de rechazarlo (denominada riesgo del

productor, y numéricamente se calcula como la unidad menos la probabilidad de aceptación).

La curva CO se construye teniendo en cuenta la distribución binomial que sigue la variable “aceptación de un lote” para un plan de 2 clases (para un plan de 3 clases, dicha variable sigue una distribución multinomial). Como ejemplo, se calcula a continuación la P_a de un plan de muestreo de 2 clases con los mismos parámetros del plan de la Figura 1.5 ($n = 10$ y $c = 2$), y para una proporción de unidades defectuosas de 0,2. La $P_a = 0,6778$:

$$\begin{aligned} P_a &= P(0 \text{ positivos}) + P(1 \text{ positivo}) + P(2 \text{ positivos}) \\ &= \frac{10!}{10!0!} (0,8)^{10} (0,2)^0 + \frac{10!}{9!1!} (0,8)^9 (0,2)^1 + \frac{10!}{8!2!} (0,8)^8 (0,2)^2 \\ &= 0,01074 + 0,2684 + 0,3020 = 0,6778 \end{aligned}$$

Al comparar distintos planes de muestreo en cuanto a su exigencia, hay que prestar atención a varios aspectos. Lo ideal es que exista una transición abrupta entre 100% aceptación y 0% aceptación en el punto del eje de abscisas donde está establecido el límite entre conformidad y no conformidad, como se puede ver en la Figura 1.6:

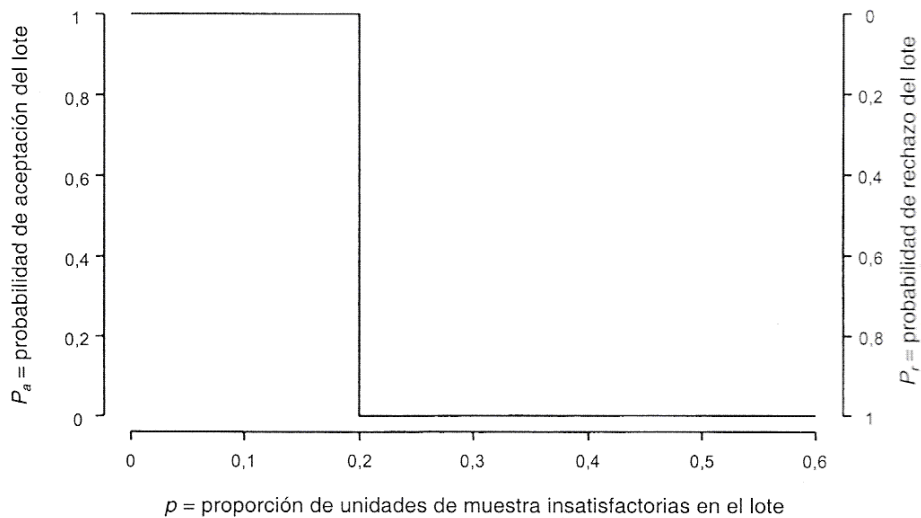


Figura 1.6. Curva CO en una situación ideal; se discrimina completamente entre los lotes que tienen una proporción de unidades de muestra insatisfactorias por encima y por debajo del 20%. Este 20% es el límite entre aceptabilidad y no aceptabilidad.

En la práctica, ningún plan de muestreo puede conseguir este ideal, aunque se deduce que, cuanto más pendiente sea una curva CO, más cerca está el plan de muestreo de este ideal. En general, cuantas más muestras se analicen, más pendiente tendrá la curva CO. Por otra parte, mientras menor sea el número c , menor será la P_a o riesgo del consumidor (y mayor el riesgo del productor) (ver Figura 1.7).

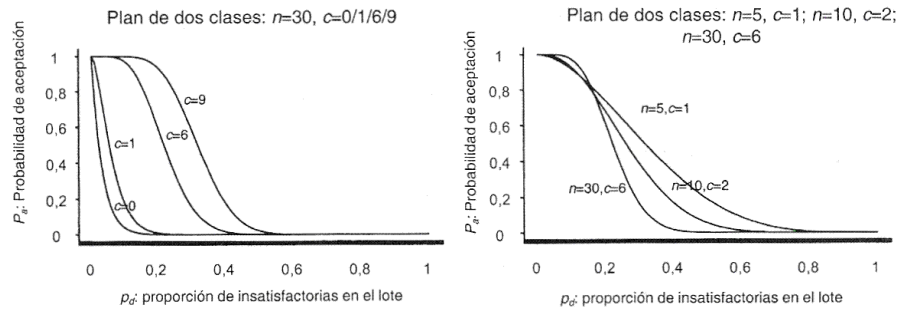


Figura 1.7. Curvas CO para distintos tamaños de muestra (n) y diferentes criterios de aceptación (c) para los planes de 2 clases.

El plan de muestreo de 3 clases se emplea en situaciones no basadas en análisis de presencia/ausencia, sino en análisis cuantitativos agrupados. En los planes de muestreo de 3 clases, la calidad de los lotes de alimentos se puede dividir en 3 clases, como se comentó anteriormente. Los resultados que superan una concentración m se consideran no deseables, aunque si sólo un cierto número c de muestras lo superan, se puede aceptar (calidad marginalmente aceptable). Sin embargo, los resultados que superen un segundo límite microbiológico M , son inaceptables, y, normalmente, un lote se rechaza si cualquier resultado analítico excede M . En este tipo de planes de muestreo, al depender la P_a de lotes de 2 fracciones que definen la calidad, es decir, de las unidades con calidad marginalmente aceptable (entre m y M) y el porcentaje de unidades inaceptables ($>M$), los gráficos resultantes no son curvas, sino superficies representadas en gráficos de 3 dimensiones, que son difíciles de comparar con las curvas CO de los planes de muestreo de 2 clases. Los planes de muestreo de 3 clases son menos exigentes que los de 2 clases.

La decisión de emplear uno u otro plan de muestreo depende del propósito y de la información *a priori* que se tenga del proceso de producción. Lo que se desarrolla a continuación tiene aplicación cuando se conoce *a priori* el proceso de producción y está bien documentado, mostrando evidencias de que los resultados de los análisis microbiológicos de los lotes del alimento

siguen, una vez transformados en logaritmos, una distribución normal. Con esta premisa, la calidad del lote se puede describir, desde un punto de vista microbiológico, mediante su media y desviación estándar. Para relacionar un plan de muestreo con la concentración, se usa la distribución de frecuencia de los resultados analíticos de las muestras analizadas para establecer la proporción de muestras defectuosas del lote (Hildebrandt y col., 1995). Así, supuesta una distribución normal para la concentración de microorganismo en unidades logarítmicas, el área bajo la curva de una función de densidad normal por encima de m , se usa para definir el valor de la proporción defectuosa para un plan de muestreo de 2 clases. Para un plan de 3 clases, el área entre m y M define la proporción marginalmente aceptable, mientras que el área a la derecha de M define la proporción defectuosa. Esto se ve claramente en la Figura 1.8.

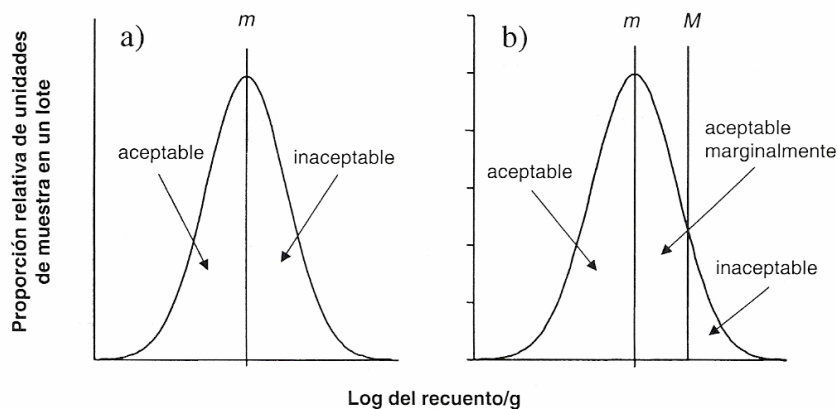


Figura 1.8. Función de densidad del recuento/g (en unidades logarítmicas) de un lote; a) Plan de atributos de 2 clases, y representación de m ; b) Plan de atributos de 3 clases, y representación de m y M .

Ahora, con estas proporciones, se puede calcular la P_a para ambos tipos de planes de muestreo (2 y 3 clases), y relacionarla con las concentraciones medias del lote que se muestrea.

Toda esta secuencia de pasos se puede ver de forma esquemática en la Figura 1.9.

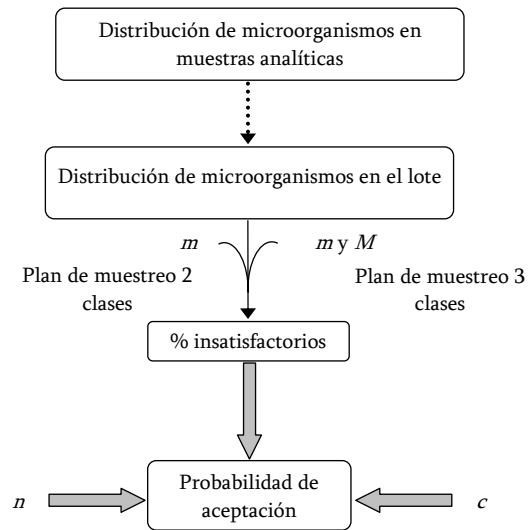


Figura 1.9. Secuencia de pasos para calcular la probabilidad de aceptación a partir de la distribución de la concentración de microorganismos en el lote (o muestras analíticas).

La Figura 1.10 representa estos pasos de forma gráfica.

Legan y col. (2001) llevaron a una hoja de cálculo los planes de atributos de 2 y 3 clases, para poder comparar planes de atributos de forma sistematizada (<http://www.icmsf.iit.edu/main/home.html>). Además, fijaron un “criterio de resultado”, aunque no en el sentido que hemos empleado hasta ahora, sino en el sentido de «concentración media de microorganismos que debe poseer un lote con desviación estándar histórica conocida que se corresponde con una P_a de 0,05». Esto significa que en el 95% de las ocasiones que se muestrea un lote, y cuando la concentración media de microorganismos en el lote es el “criterio de resultado” fijado, tomaremos la decisión acertada de rechazar el material.

Cuando la distribución de microorganismos en un lote es conocido o se puede asumir, una opción alternativa es usar planes de muestreo de variables. Tales planes, que hacen uso sólo de datos cuantitativos de recuentos microbianos, pudieran ser más útiles que los planes de atributos bajo ciertas condiciones.

Como se dijo anteriormente, existe una relación entre los planes de muestreo y los FSOs que merece consideración. Dahms (2004) proporciona un ejemplo para *Listeria monocytogenes*. Según ICMSF (2004), el plan de

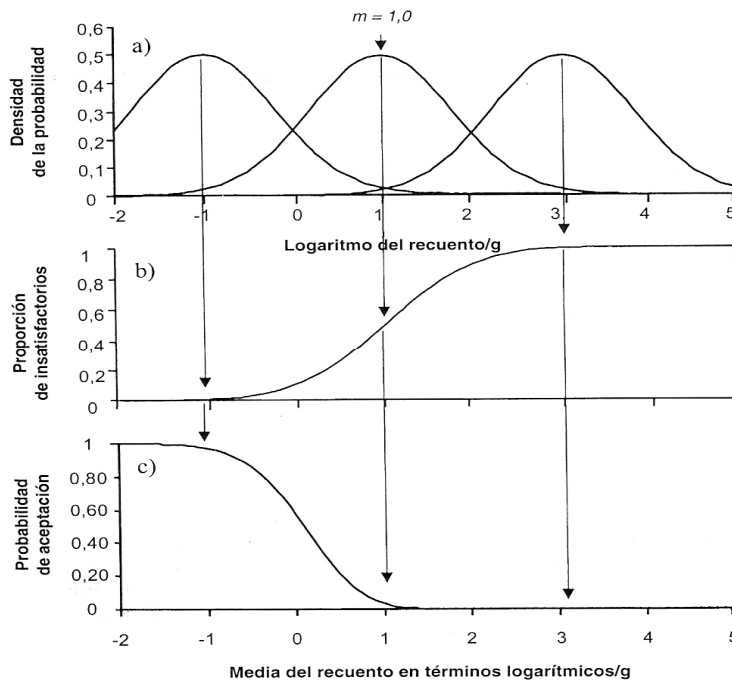


Figura 1.10. a) Función de densidad de la concentración de microorganismos de 3 lotes distintos; b) proporción de unidades insatisfactorias *vs* concentración media de los lotes; c) probabilidad de aceptación *vs* concentración media de los lotes.

muestreo sugerido para *L. monocytogenes* en salmón ahumado (caso 11; no se espera que ocurra ni inactivación ni crecimiento antes del consumo) es un plan de 2 clases con $n = 10$, $c = 0$, eligiendo un límite microbiológico m que se corresponde con un FSO de 100 ufc/g (van Schothorst, 1994). Asumiendo una distribución log-normal de *L. monocytogenes* con una desviación estándar de 0,8 en cada lote analizado, aquellos con una concentración media de 1,47 log ufc/g se rechazarían con un 95% de probabilidad, mientras que los lotes con una concentración media de $-1,21 \times 10^{-5}$ log ufc/g se aceptarían con un 95% de probabilidad. La Figura 1.11 representa estos dos lotes hipotéticos. El lote de media 1,47 ufc/g presentará un 26% de producto con una carga microbiana mayor que m o FSO (2 log ufc/g), mientras que en el otro lote, tan sólo un 0,6% de producto contendrá un nivel microbiano superior a m o FSO.

Con todo esto, se quiere demostrar que no se considera apropiada la asignación directa de un determinado FSO a un límite microbiológico m de un plan de muestreo, pues dada la naturaleza estocástica de los planes de muestreo, se estaría asumiendo que el FSO no se puede alcanzar en todos los casos (lotes) con un 100% de confianza.

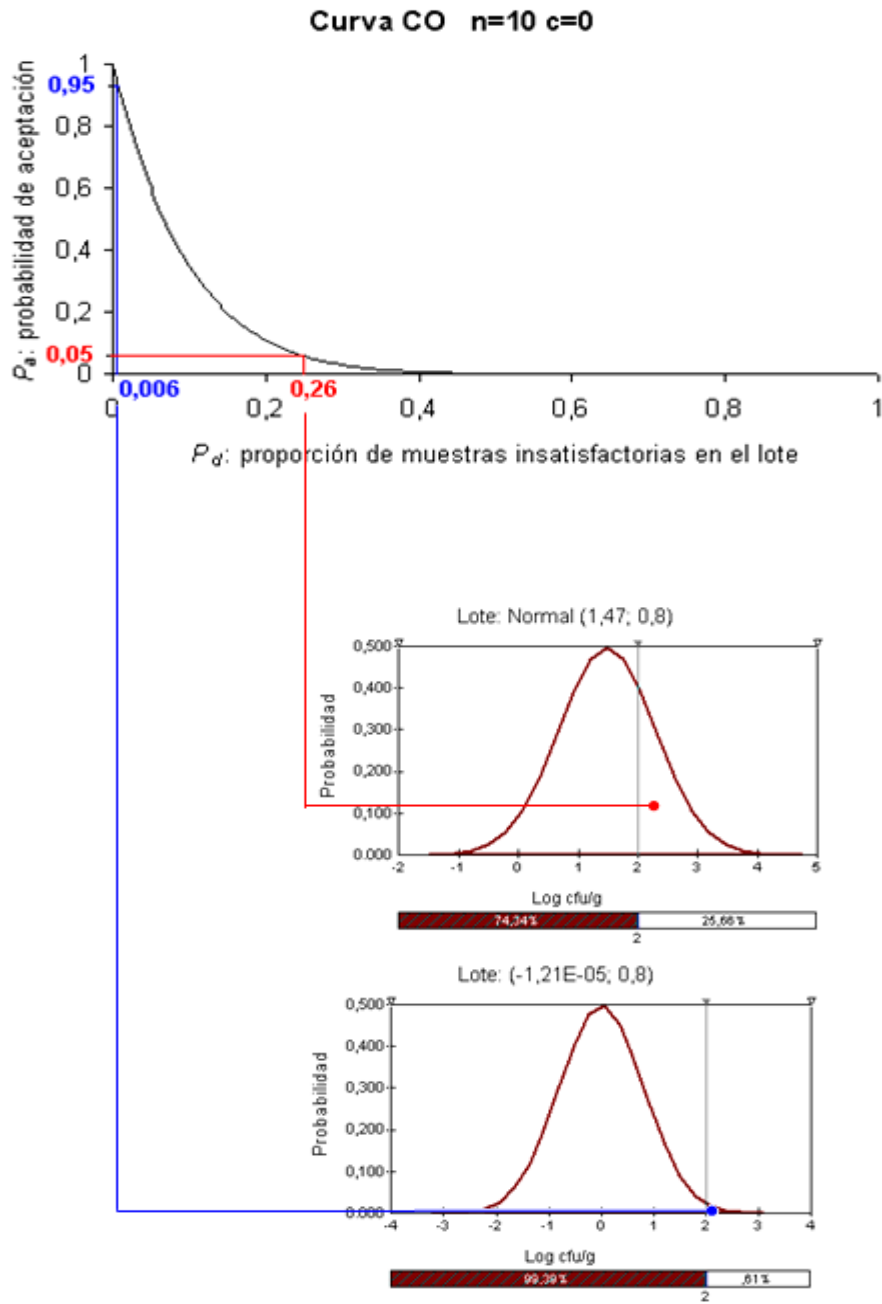


Figura 1.11. Correspondencia de una $P_a=0,95$ y $P_a=0,05$ de una curva CO ($n=10$, $c=0$) con dos lotes hipotéticos con desviación estándar = $0,8$ log ufc/g. Las medias de los correspondientes lotes son $1,47$ y $-1,21 \times 10^{-5}$ log ufc/g.

1.3. EVALUACIÓN DEL RIESGO

1.3.1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de Evaluación del riesgo (ER) se vienen usando desde hace algunas décadas en campos como las empresas de seguros, análisis de mercados financieros, estimación de presupuestos de grandes proyectos de construcción, amenazas para la salud humana y medioambiental derivadas de actividades industriales, o riesgos por daños debidos a fallos mecánicos en equipos y maquinaria. No muy atrás, estas técnicas de ER se han aplicado a los riesgos biológicos relacionados con el agua de bebida y, recientemente, a la seguridad microbiológica de los alimentos. Durante este tiempo, las técnicas para la ER han mejorado y evolucionado desde análisis cualitativos hasta la situación actual en la que se pueden realizar descripciones del riesgo enteramente cuantitativas. La evaluación formal del riesgo de patógenos alimentarios se está promoviendo activamente por parte de autoridades competentes e industrias alimentarias tanto a nivel nacional como a nivel internacional (Ross y McMeekin, 1995).

La ER es un proceso con fundamento científico formado por cuatro etapas: identificación del peligro, caracterización del factor de peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.

A continuación se desarrollan cada una de estas etapas.

1.3.2. IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO

Este paso establece la relación entre un agente patógeno, una enfermedad y un alimento como vector de la misma. En Evaluaciones del Riesgo microbiológico, el peligro es con frecuencia inequívoco, en comparación con los riesgos que entrañan los tóxicos químicos. Muchos peligros microbiológicos son ya conocidos y la relación entre la enfermedad humana, el patógeno y el alimento como vehículo, está bien documentada. La literatura médica y científica aporta evidencias epidemiológicas y médicas irrefutables de peligros microbiológicos asociados a enfermedades alimentarias.

Cabría la posibilidad de evaluar la exposición de una población a un patógeno meramente sospechoso, pero por definición, una Evaluación del Riesgo no puede completarse a menos que la relación causal entre la exposición al patógeno y la enfermedad humana sea conocida. Sin embargo, aunque un patógeno específico nunca se haya vinculado a un alimento

específico como vector, el potencial de asociación entre ambos puede ser objeto de evaluación.

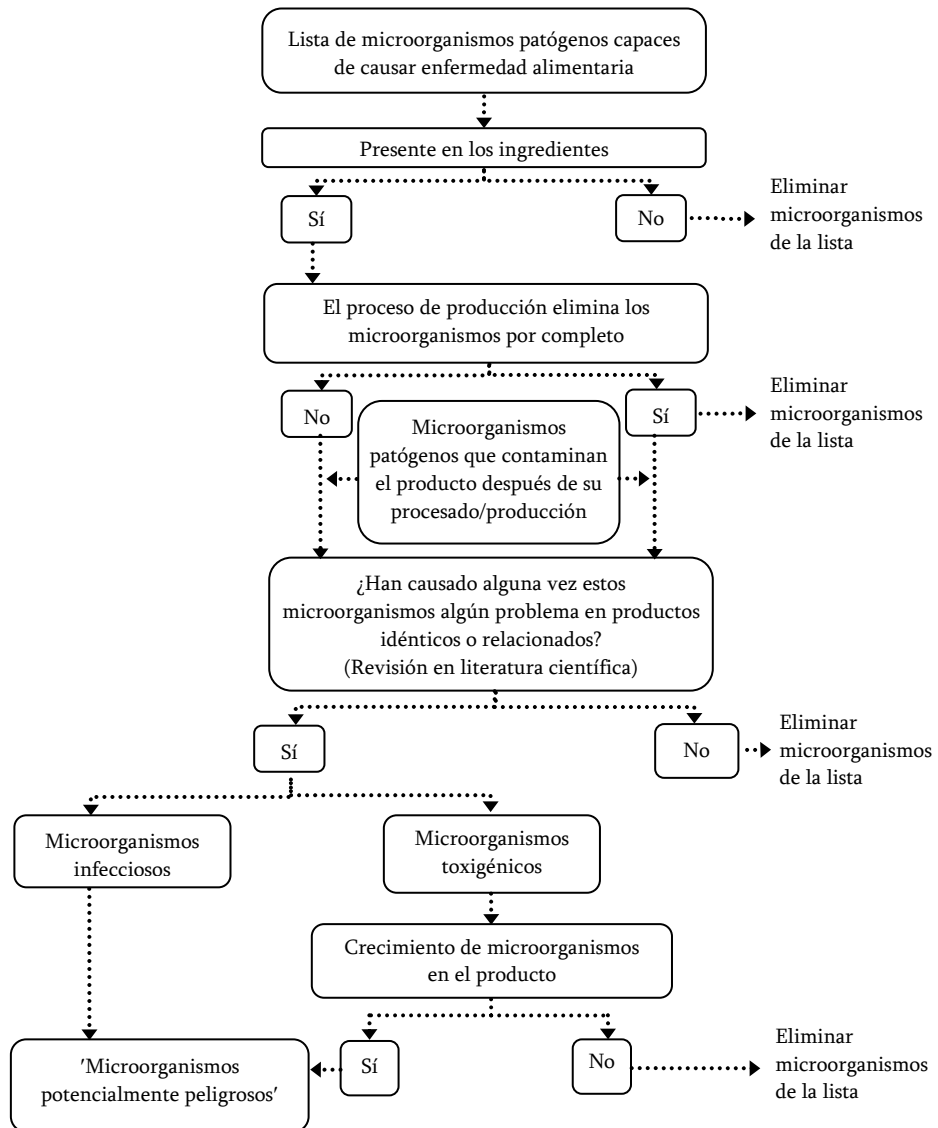


Figura 1.12. Árbol de decisión para ayudar en la identificación de peligros microbianos en alimentos (Notermans y Mead, 1996).

Existen varias herramientas útiles para determinar si un patógeno es, o podría ser, un peligro importante en una combinación dada alimento-proceso. Estas incluyen varios sistemas de puntuación semicuantitativos, árboles de decisión y sistemas expertos (Notermans y Mead, 1996; Todd y Harwig, 1996; van Schothorst, 1997; van Gerwen y col., 1997; ICMSF, 1998), como el mostrado en la Figura 1.12.

Los árboles de decisiones permiten compartir la experiencia de las personas interesadas en este ámbito, a la vez que ayudan en la toma de decisiones mediante la presentación de una serie estructurada de cuestiones relevantes.

La epidemiología juega un importante papel en la identificación de peligros.

1.3.3. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

La evaluación de la exposición tiene por objetivo estimar:

- La frecuencia de exposición de los consumidores al peligro presente en el alimento.
- La frecuencia de consumo del alimento en cuestión.
- El nivel de contaminación del alimento en el momento de consumo.

En relación con el primer y segundo aspecto, se precisa conocer los patrones de consumo de alimentos. Estos datos se pueden obtener de diferentes fuentes, siendo la más empleada las encuestas de nutrición humana, aunque presentan algunas limitaciones, como es la no inclusión en las encuestas de ciertos alimentos de interés. Además, en estudios de consumo, los alimentos se agrupan usualmente atendiendo a sus propiedades nutricionales (p. ej., proteína, sal, grasa, vitaminas, nivel calórico), que guardan escasa relación con la ecología microbiana del producto.

Por otra parte, las encuestas de consumo de alimentos no recogen una información demográfica detallada (normalmente, sólo se contempla la edad o el género); sería de enorme utilidad obtener información demográfica que discrimine a los consumidores en diferentes categorías de riesgo, p. ej., personas inmunodeprimidas. Tampoco se contemplan en estos estudios detalles importes como son de la forma en la que se consume el alimento, o las condiciones de almacenamiento previo a su consumo. Además, también es cierto que algunos datos específicos de consumo que se obtienen a través de las encuestas no se publican por razones de confidencialidad. En España, el Panel de consumo alimentario publicado por el Ministerio de Agricultura,

Pesca y Alimentación constituye una fuente de información de acceso público. Los datos más relevantes en relación con el consumo de ensaladas de IV gama se recogen en el Capítulo 3.

Otra fuente de datos complementaria a las encuestas de consumo son las bases de datos de inventario de los fabricantes de alimentos. Pese a que estas bases de datos no proporcionan información detallada relativa a los compradores, constituyen un recurso válido para conocer el número de unidades vendidas de cada producto. Muchos fabricantes poseen estimaciones de sus ventas y, de esta información, se pueden derivar estimaciones de consumo a nivel local y nacional. La confidencialidad comercial puede restringir el acceso a este tipo de datos. Una información similar se puede conseguir en empresas dedicadas a la investigación de mercado, que determinan preferencias de los consumidores y volúmenes de ventas.

Para llevar a cabo una Evaluación de Riesgos, se deben obtener datos relativos al consumo. Además, se debe conocer el tipo de población que consumirá el producto así como la manipulación del mismo previo al consumo.

En cuanto al nivel de contaminación del alimento en el momento de consumo, se ha de admitir que se trata de una información difícilmente disponible de forma directa, por lo que usualmente se deduce a partir de información obtenida en algún estadio previo al momento de consumo, durante la vida comercial del producto. La evaluación de la exposición requiere, por tanto, conocer los cambios que ocurren en el producto desde el momento en que se contamina, ya sea durante el procesado, almacenamiento, transporte o preparación del alimento hasta su consumo. Esto incluye la cuantificación de la inactivación, concentración, dilución o amplificación de la frecuencia y concentración de patógenos en alimentos y/o sus ingredientes.

Se precisan datos relativos a la duración y condiciones ambientales de los procesos y manipulación a los que se someten los alimentos para evaluar la exposición.

Toda esta información se traduce en una estimación del número de patógenos en el producto en el momento de consumo. Esta tarea es clara competencia de la microbiología predictiva, que proporciona parte de la base científica de la ER microbiológica en alimentos. La sinergia entre microbiología predictiva y la ER cuantitativa es un hecho reconocido por numerosos autores (Buchanan y Whiting, 1996; Foegeding, 1997;

Lammerding, 1997; van Gerwen y Zwietering, 1998; McNab, 1998; McMeekin y col., 2000; Lammerding y Fazil, 2000).

1.3.3.1. Microbiología predictiva

La microbiología predictiva es un área de la microbiología de los alimentos que estudia las repuestas microbianas a factores medioambientales bajo condiciones controladas y definidas; por esta razón, la microbiología predictiva se viene denominando en los últimos tiempos «ecología cuantitativa microbiana de los alimentos» (Ross y McMeekin, 2003). Las respuestas son cuantificadas y resumidas mediante ecuaciones matemáticas que, mediante interpolación, pueden predecir respuestas microbianas a nuevas condiciones, es decir, aquellas que no han sido estudiadas (Ross y McMeekin, 1995).

Uno de los aspectos más importantes del desarrollo de modelos predictivos es asegurar que las predicciones dadas por el modelo son aplicables a situaciones reales. Este proceso se denomina validación (Brocklehurst, 2004). Una vez que un modelo ha sido validado en un producto, puede emplearse en cualquier punto de la cadena de la huerta a la mesa”, desde la producción primaria, transformación en industria hasta la distribución y venta del producto.

En la actualidad, se pueden distinguir dos tipos de modelos predictivos: cinéticos y estocásticos (Tienungoon y col., 2000). Los primeros tratan de predecir un parámetro cinético de la población microbiana (tasa de crecimiento, tasa de inactivación, tiempo de adaptación, tiempo de generación) en función de factores medioambientales físico-químicos-microbiológicos. Los segundos versan sobre la probabilidad de crecimiento de los microorganismos en unas determinadas condiciones medioambientales físico-químicos-microbiológicos (Ratkowsky y Ross, 1995; Presser y col., 1998; Bolton y Frank, 1999; Tienungoon y col., 2000; McMeekin y col., 2000; Salter y col., 2000; Le Marc y col., 2002; Le Marc y col., 2005). Tradicionalmente, se vienen empleando poblaciones microbianas para desarrollar ambos tipos de modelos. Sin embargo, desde finales de la década de los 90 y principios del 2000, se ha comenzado a trabajar con células individuales por ajustarse mejor a la situación real de bajo nivel de contaminación de los alimentos por patógenos. La aplicación de la microbiología predictiva en las ER (Lammerding y McKellar, 2004) ha impulsado el desarrollo de este tipo de estudios con células individuales (Baranyi, 2002).

Muy recientemente, ha surgido una nueva generación de modelos como consecuencia de la necesidad de modelar procesos de contaminación microbiana cuya ocurrencia e implicación en brotes de origen alimentario ha sido demostrada por estudios epidemiológicos: se trata de los modelos de contaminación cruzada (Den Aantrekker y col., 2003; Schaffner, 2004).

Los modelos cinéticos de crecimiento son los que más se han desarrollado. Se pueden dividir en primarios, secundarios y terciarios o softwares de predicción. Los modelos primarios son expresiones matemáticas que describen los cambios en concentraciones microbianas a lo largo del tiempo. Persiguen explicar el proceso de crecimiento con tan pocos parámetros como sea posible, y a la vez ser capaz de definir con exactitud las distintas fases del crecimiento bacteriano (fase de adaptación, de crecimiento exponencial y estacionaria). El modelo de Baranyi y Roberts (1994) es el más ampliamente utilizado, dado su uso en condiciones medioambientales dinámicas, y la disponibilidad gratuita de un Excel add-in (DMFit, Institute of Food Research, Norwich, UK) (<http://www.ifr.ac.uk/safety/DMFit/default.html>) que incorpora el modelo de Baranyi para ser ajustado a los datos experimentales.

Los modelos secundarios son aquellos que describen el efecto de las condiciones medioambientales (físicas, químicas y/o biológicas) sobre los valores de los parámetros de un modelo primario. Los modelos secundarios más ampliamente utilizados son los modelos polinomiales (McClure y col., 1993), los modelos de raíz cuadrada (Ratkowsky y col., 1982) y el concepto Gamma (Zwietering y col., 1996). Los modelos polinomiales son atractivos, en primer lugar, porque son fáciles de ajustar a los datos experimentales por una simple regresión lineal múltiple, y en segundo lugar, porque permiten tener en cuenta cualquier factor medioambiental y su interacción con otros factores. Sin embargo, incluyen muchos coeficientes que no tienen interpretación biológica. Los modelos de raíz cuadrada se emplean muchísimo dada su bondad de ajuste a multitud de conjuntos de datos, y además, la expresión matemática tiene un parámetro con sentido biológico, la temperatura mínima de crecimiento, que siempre es deseable en los modelos predictivos. El concepto Gamma supone que los factores que afectan al crecimiento microbiano (temperatura, pH,...) actúan de forma independiente, y su efecto inhibitorio conjunto se deriva de multiplicar las funciones matemáticas asociadas a dichos factores. Cada una de estas funciones se puede expresar como una fracción de la tasa máxima específica de crecimiento que tiene lugar al nivel óptimo del factor que produce máximo crecimiento.

Los softwares de predicción proporcionan una interfaz entre las matemáticas subyacentes y el usuario, permitiendo la entrada de inputs y la observación de las estimaciones a través de outputs gráficos simplificados. Las matemáticas subyacentes no son otra cosa que una integración de los modelos primarios y secundarios. Algunos softwares de predicción que han cobrado gran importancia en los últimos años son el Pathogen Modeling Program (PMP) (<http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6786>), ComBase Predictor (<http://www.combase.cc/predictor.html>), Perfringens Predictor, (<http://www.ifr.ac.uk/Safety/GrowthPredictor/default.html>), Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) (<http://www.dfu.min.dk/micro/sssp/Home/Home.aspx>), y los complementos para Excel DMFit (<http://www.ifr.ac.uk/safety/DMFit/default.html>) y GInaFit (<http://cit.kuleuven.be/biotec/>).

1.3.4. CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO

La caracterización del peligro o caracterización dosis-respuesta trata de relacionar la probabilidad y severidad de la enfermedad con la dosis ingerida del patógeno. Los escasos estudios disponibles se han llevado a cabo en varones adultos sanos (generalmente presidiarios o soldados) de los que se espera una mayor resistencia intrínseca que los grupos jóvenes, ancianos, inmunodeprimidos o mujeres embarazadas. Teunis y col. (1996) y Kothary y Babu (2001) resumieron la información dosis-respuesta disponible para patógenos entéricos. Para *Listeria monocytogenes*, McLauchlin y col. (2004) presentaron una revisión de las relaciones dosis-respuesta para su inclusión en las ER microbiológicas.

Se han realizado también estudios en modelos animales de laboratorio, pero se ha de tener en cuenta que existe una incertidumbre en la relación entre los resultados obtenidos con modelos animales, genéticamente homogéneos y sanos, y lo que pudiera esperarse en la población humana heterogénea.

Otro método para estimar relaciones dosis-respuesta hace uso de datos epidemiológicos, particularmente aquellos procedentes de brotes alimentarios. Así, para caracterizar la relación dosis-respuesta para *L. monocytogenes*, Buchanan y col. (1997) usaron datos relativos a la incidencia y nivel de contaminación por *Listeria* en un único producto en la población alemana. De igual forma procedieron Lindqvist y Westö (2000). Buchanan y col. (1997) calcularon un nivel conservador para *L. monocytogenes*, esto es, el valor razonable más bajo para una dosis infectiva 50 (DI₅₀). Esta aproximación (y quizás las aproximaciones para la ER en general) ha sido criticada por

“empañar” los detalles, pues agrupa todos los tipos de población, quedando la DI_{50} fuertemente sesgada hacia la respuesta de la población mayoritaria, la población sana. Idealmente, la relación dosis-respuesta debería reflejar no sólo la probabilidad de que una persona perteneciente a la media poblacional enferme, sino también la susceptibilidad de varias subpoblaciones.

Existe controversia a la hora de decidir qué modelo matemático dosis-respuesta es más apropiado. Los dos más empleados son el modelo beta-Poisson y el modelo exponencial (Haas, 1983). No existen datos fiables con los que evaluar completamente dichos modelos, y es improbable que se dispongan de estos datos en un futuro cercano debido a consideraciones éticas al trabajar con personas.

El modelo exponencial es el modelo dosis-respuesta más simple. Supone que cada virus o célula posee potencial para causar infección hasta un nivel asintótico por encima del cual la probabilidad de infección no aumenta. Así pues, 100 células en 1 unidad de producto representarían el mismo riesgo que 100 células repartidas en 100 unidades de producto (1 célula/unidad).

Martin y col. (1995) publicaron una serie de relaciones dosis-respuesta para 13 patógenos alimentarios, siendo la fuente de información una consulta a expertos. Dichos autores afirman que la información obtenida de una consulta a expertos no debe sustituir en modo alguno datos científicos, que estimarían de forma exacta las relaciones dosis-respuesta y su varianza. Sin embargo, proponen que “dada la dificultad de recopilar datos experimentales de patógenos, esta información puede proporcionar una caracterización del riesgo que representan estos patógenos microbianos para la población según juicios científicos”.

Buchanan y col. (2000) y la FAO/WHO (2003) proporcionan información detallada de las aproximaciones y los problemas derivados de desarrollar modelos dosis-respuesta para patógenos microbiológicos en alimentos y agua.

1.3.5. CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO

La caracterización del riesgo es una síntesis de la evaluación de la exposición y la caracterización dosis-respuesta, es decir, una combinación de todos los datos recopilados y sus interrelaciones. Todo ello resulta en una estimación cuantitativa o cualitativa de la probabilidad de ocurrencia y severidad de las consecuencias que conlleva una combinación producto-patógeno en la salud de una población específica.

La caracterización del riesgo se puede llevar a cabo y comunicar de varias formas:

- Medidas absolutas de riesgo (p. ej., frecuencia con que se presenta una enfermedad debido a una combinación producto-patógeno de interés) o el riesgo relativo según un determinado nivel de riesgo existente o conocido.

- Estimaciones del riesgo basadas en estimaciones puntuales, p. ej., medias.

- Medias, peores casos y estimaciones conservadoras basadas en las mismas medidas de cada variable implicada en la ER.

- Estimaciones derivadas de la combinación de distribuciones de frecuencias de posibles valores de la mayoría o todas las variables implicadas en la evaluación, para dar un “mapa” tan completo como sea posible del rango de resultados posibles y la probabilidad de cada uno.

Hasta la llegada de softwares de modelado y simulación estocástica, muchas ER, a efectos de salud pública, se nutrieron de supuestos y combinaciones de series de valores conservadores, medias y peores casos para deducir una estimación puntual que presumiblemente era muy conservador y protector para la salud pública. El punto débil de esta aproximación, sin embargo, consiste en el “problema del conservadurismo compuesto”, en el que la combinación de una secuencia de estimaciones conservadoras lleva a una evaluación final que es demasiado conservadora, es decir, que sobreestima el riesgo en exceso. La aproximación en la que se emplea modelado y simulación estocástica es la opción actualmente preferida por la mayoría de los investigadores. Sin embargo, esta afirmación contrasta con el esfuerzo truncado de algunos investigadores que han intentado llevar a cabo una ER mediante simulación estocástica, y se han encontrado con el obstáculo de la falta de datos, por lo que finalmente han recurrido a métodos más simples para desarrollar la ER. Los métodos semi-cuantitativos quizás permitan ER más simples, llevadas a cabo de forma más rápida y menos costosa, y además proporcionando los beneficios de un método sistemático. También se pueden emplear estos métodos más simples para discriminar y determinar cuáles son los peligros más importantes y los que requieren una evaluación cuantitativa y más detallada.

1.3.6. METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO

Los pasos básicos implicados en el desarrollo de una ER son:

- 1.3.6.1. Planteamiento del problema.
- 1.3.6.2. Recopilación de datos.
- 1.3.6.3. Descripción del sistema (modelado).
- 1.3.6.4. Caracterización del riesgo y sus usos.
- 1.3.6.5. Validación/evaluación del modelo.

1.3.6.1. Planteamiento del problema

El principal propósito de una ER es apoyar/ fundamentar decisiones. El proceso de ER debe comenzar identificando el problema que debe ser tratado o la decisión que debe tomarse. Esto conduce a la identificación de la información que el gestor del riesgo necesita para tomar dicha decisión; el gestor del riesgo debe comunicarlo a otras partes interesadas. La ER debe proporcionar la información requerida por el gestor del riesgo.

Dependiendo del problema, no todas las ER deben ser igual de completas o detalladas. La exposición de las razones por las que se precisa una ER, su relevancia y los recursos disponibles para llevar a cabo la ER, ayudará a definir qué parámetros se requieren de dicha ER. La cuantía de recursos puestos a disposición del equipo de ER no debe exceder la magnitud del problema.

De entre todos los peligros potenciales que pueden estar presentes en un producto alimenticio, las aproximaciones semi-cuantitativas de ER pueden emplearse para identificar aquellos que precisan una ER más completa o detallada (van Gerwen y col., 1997; van Gerwen y col., 2000). La Figura 1.13 muestra un diagrama de flujo del proceso de ER e indica algunos puntos de decisión en dicho proceso que ayudan a definir el objetivo y alcance de la ER.

1.3.6.2. Recopilación de datos

La obtención de datos para el desarrollo de una ER es probablemente el aspecto que más tiempo lleva de todas las tareas que se han de llevar a cabo. Se espera que, a medida que la ER se convierta en una práctica más extendida, el acopio de datos sea mayor, y una vez recopilados, se organicen para facilitar el acceso a los mismos por otros usuarios y para otros usos. Algunos foros han propuesto la creación de las llamadas “clearing house” para este propósito. Así, Estados Unidos ha establecido una “clearing house” para la ER

microbiológico en alimentos dentro del Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (<http://www.foodriskclearinghouse.umd.edu/>), de la que es posible extraer datos generados en ER, y aplicarlos en ER posteriores.

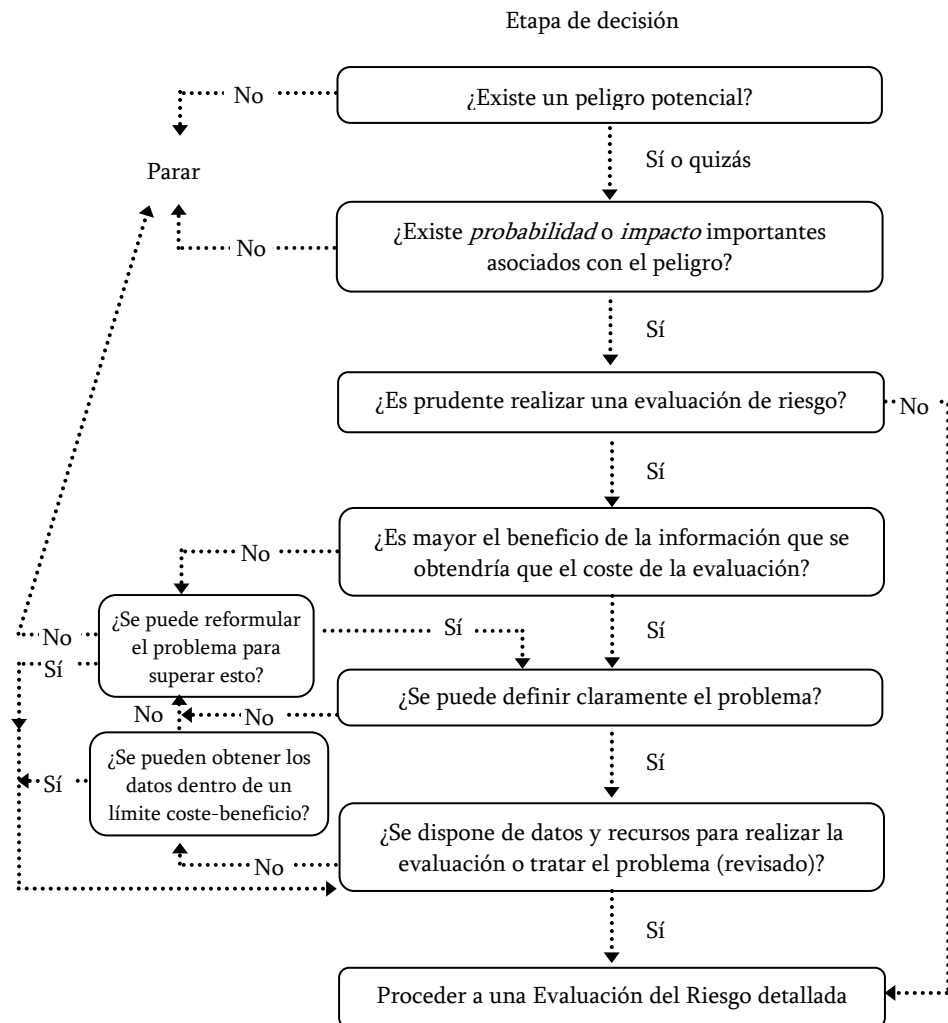


Figura 1.13. Árbol de decisiones para proyectos de Evaluación del Riesgo microbiológico. Se puede aplicar el mismo proceso en la primera etapa del plan APPCC.

Codex Alimentarius (1999) afirma que no siempre se contará con recursos suficientes para la obtención de datos, y que es probable que existan limitaciones para la ER que influirán en la calidad de la estimación de los riesgos. Cuando tengan lugar tales limitaciones, es importante, en aras de la transparencia, que estas queden descritas formalmente en un informe.

Cuando corresponda, este informe incluirá una evaluación de las repercusiones que tienen las limitaciones de recursos en la ER.

En otros casos, cuando no es posible la generación de datos debido al alto coste, se recurre a la literatura científica para extraer datos apropiados o relacionados que puedan servir como aproximaciones o supuestos.

En el apartado *1.3.3. Evaluación de la exposición*, se comentó algunas de las fuentes de información disponibles.

1.3.6.3. Descripción del sistema a través de modelos

Modelo conceptual

Los peligros pueden presentarse en cualquier fase de la cadena “de la huerta a la mesa” del alimento. Por tanto, el sistema objeto de análisis se ha de considerar como una cadena de sucesos continuados, a menudo desde el momento de su producción (huerta, recolección, etc.) hasta el momento del consumo (manipulación por el consumidor), por lo que los peligros identificados en una fase concreta no se pueden considerar de forma aislada. Para evaluar el riesgo es necesario entender en qué punto se presenta el peligro, y cómo y por qué cambia a lo largo de la cadena “de la huerta a la mesa”. El sistema se puede describir de distintas formas; la forma más fácil de comenzar la descripción consiste en el uso de diagramas, tales como el diagrama de flujo, que muestra el origen de los peligros y las relaciones y operaciones que pueden modificarlo durante la vida comercial del producto. Esta descripción del proceso se denomina “modelo conceptual”.

Para la ER microbiológico en alimentos, Nauta (2002) propuso una descripción de la cadena “de la huerta a la mesa” basada en 6 módulos (crecimiento, inactivación, mezclado, separado, eliminación y contaminación cruzada), ejerciendo cada uno de ellos un efecto positivo, negativo o nulo sobre la prevalencia y concentración de los microorganismos en el alimento, y afirmando que cada una de las fases de la cadena “de la huerta a la mesa” se puede modelar asignándole uno u otro módulo. A este modelo lo denominó modelo del riesgo por procesos modulares (MPRM; Modular Process Risk Model).

Mientras las industrias alimentarias desarrollan estrategias para la gestión de patógenos dentro de los límites de la industria, la seguridad del producto final recae, en definitiva, en toda la cadena “de la huerta de la mesa” del alimento, constituyendo pues, la industria alimentaria, una de las múltiples

etapas de la cadena. Ross y McMeekin (1995) apuntan que, debido a esta consideración, incluso las industrias alimentarias necesitarán desarrollar un modelo conceptual global.

Modelo matemático

El modelo conceptual puede plasmarse mediante la construcción de un modelo matemático. En este proceso, es necesario identificar las variables que entrarán a formar parte del modelo matemático; se debe tener en cuenta que existen variables asociadas a la exposición del consumidor al patógeno (evaluación de la exposición), y variables asociadas con la susceptibilidad del consumidor (relaciones dosis-respuesta). Una vez identificadas, se definirían matemáticamente las relaciones entre ellas usando notaciones algebraicas y ecuaciones. Si las ecuaciones poseen solución explícita, proporcionan una estimación numérica de la ER.

En cuanto a las variables, se debe decidir qué valores van a tomar. Típicamente, las variables asociadas a la evaluación de la exposición no toman valores únicos, sino que están caracterizadas por un rango de posibles valores. El método más primario de describir la variable es mediante su moda o media. De esta forma, el modelo matemático proporcionaría una ER caracterizada por el escenario más común. Sin embargo, esta aproximación no tiene en cuenta circunstancias que, aunque poco probables, tienen gran relevancia. Por ejemplo, la exposición a niveles bajos de *L. monocytogenes* (p. ej., <100 ufc/g) es común en alimentos listos para consumo. Para una persona perteneciente a la media poblacional, la probabilidad de enfermar por ingestión de dichos niveles es prácticamente nula, no así para los grupos de población de alto riesgo, en los que el riesgo de infección y severidad aumenta considerablemente. Por tanto, una ER en el que se empleen los valores medios para representar las variables podría subestimar el verdadero riesgo. Por otra parte, algunos asesores del riesgo han caracterizado las variables mediante valores que representan el riesgo de forma más adecuada, p. ej., percentiles 90% ó 95%, si bien esto podría acarrear el problema del conservadurismo compuesto (Cassin y col., 1996), comentado anteriormente.

El empleo de estimaciones puntuales de las variables no puede proporcionar una ER completa (Whiting y Buchanan, 1997), puesto que muchas de las variables del modelo no toman un valor único, sino que pueden tomar varios, dando como resultado de la ER un “espectro” con todos los posibles valores generados, cada uno dotado de una probabilidad, aportando así variabilidad e incertidumbre al modelo. Estos dos aspectos se verán más

adelante. El modelado estocástico es el método de elección para llevar a cabo una ER teniendo en cuenta estas consideraciones.

Modelado estocástico

La realidad de las variables o factores que afectan a los riesgos microbiológicos para la seguridad alimentaria, es que no toman un único valor, sino un conjunto de valores, algunos de los cuales son más probables que otros; en otras palabras, siguen una distribución de probabilidad. Muchas distribuciones se pueden describir por una única ecuación matemática, y estas ecuaciones se pueden emplear, en lugar de valores fijos para variables, en un modelo conceptual matemático. Esta aproximación genera modelos estocásticos. Whiting y Buchanan (1997) fueron los primeros que presentaron el modelado estocástico en la ER de *Salmonella enteritidis* en huevo líquido pasteurizado.

La respuesta que se obtiene de resolver un modelo matemático estocástico se denomina solución explícita. Dicha solución es una distribución de valores basada en todas las posibles combinaciones de circunstancias y, por lo tanto, muestra el rango de posibles resultados, además de la probabilidad asociada a cada resultado. Cada combinación de factores se puede considerar como un “escenario”, y el resultado final del modelo se basa en un “conjunto de escenarios”. La solución explícita ofrece un “mapa” completo del rango de resultados y probabilidad de todos los escenarios, y proporciona mucha más información que un cálculo basado en valores únicos, aislados.

Típicamente, los softwares de modelado por simulación (p. ej., @Risk, Crystal Ball, Analytica) se usan para analizar sistemas complejos o procesos para los que no existen modelos matemáticos explícitos o son difíciles, si no imposibles, de resolver. Así, los softwares automatizan el cálculo de las posibles combinaciones de los factores calculando la respuesta muchas veces de forma secuencial. Cada una de estas veces se denomina iteración, y representa un escenario. Generalmente se realizan miles de iteraciones. En cada iteración se selecciona un valor del rango de cada variable (aleatoriamente de acuerdo con la distribución de probabilidad que describe dicha variable), y el resultado es evaluado para un conjunto de circunstancias. Esta técnica se denomina simulación de Monte Carlo. Todos esos valores se agrupan para generar una distribución de posibles resultados, cada uno dotado de una cierta probabilidad de ocurrencia.

El modelado por simulación es una herramienta tremendamente útil, e incluso fácil de emplear, pero se ha de tener presente que se pueden

introducir errores si no se aplica correctamente, dando lugar a modelos matemática o lógicamente incorrectos. Un problema generalizado es la inclusión de relaciones entre variables que contemplen combinaciones de condiciones que no ocurrirían nunca en la práctica. Por ejemplo, el rango de tiempos y temperaturas de almacenamiento de un alimento se puede describir independientemente por distribuciones separadas. Si la relación entre estos factores no se especifica en el modelo, el modelo podría generar predicciones basadas en tiempos dilatados y temperaturas altas de almacenamiento, situación que, de forma muy improbable se observarían en la práctica, pues las temperaturas más altas están generalmente asociadas a una vida comercial corta en alimentos perecederos.

Se debe entender el alcance y las limitaciones del modelado estocástico; los resultados de la ER dependen de las relaciones entre las variables, de los supuestos incluidos en el modelo y de las distribuciones de probabilidad asignadas a las variables. Cuando estos aspectos se tratan convenientemente, el software de simulación puede proporcionar una forma de identificar y ordenar los factores que inciden sobre el riesgo así como la cuantificación de los niveles de riesgo.

Los trabajos de Morgan (1993), Burmaster y Anderson (1994), Vose (1998) y EPA (1997) proporcionan guías para llevar a cabo el modelado por simulación en una ER.

1.3.6.4. Caracterización del riesgo y sus usos

La caracterización del riesgo, último eslabón en la ER, proporciona información que, según el tipo de ER sea cualitativo o cuantitativo, consistirá en descriptores de riesgo (p. ej., “bajo”, “moderado”, “alto”, “extremo”) o en una distribución de estimaciones de casos de enfermedad, tal y como se presenta en la Figura 1.14.

En ambos casos a) y b) de la Figura 1.14 se representa la probabilidad asociada al número de casos de enfermedad, sólo que en el caso a), la probabilidad que se representa es la asociada a cada valor en el eje de abcisas (densidad de probabilidad), mientras que en el caso b), se representa la probabilidad acumulada hasta cada valor del eje de abcisas (probabilidad acumulada).

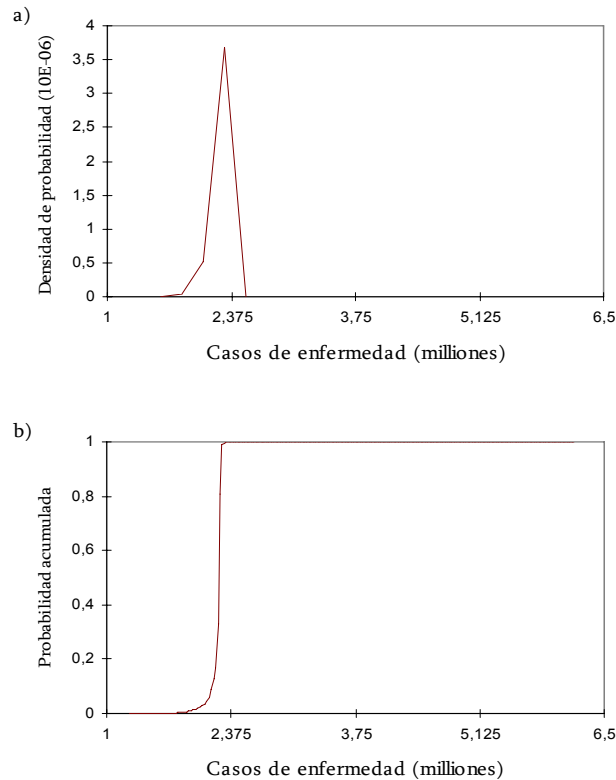


Figura 1.14. Dos presentaciones de los resultados de una ER cuantitativa mediante el uso del modelado estocástico. a) Función de densidad. b) Función de distribución.

Variabilidad e incertidumbre

La aceptación de un grado de incertidumbre y variabilidad es fundamental para la estimación del riesgo de cualquier modelo. La incertidumbre se refiere a la información requerida para llevar a cabo una ER y que no está disponible o tiene que ser supuesta o inferida, p. ej., la simplificación de procesos complejos en modelos matemáticos. La variabilidad es una propiedad inherente de algunos sistemas. Existe variabilidad natural (heterogeneidad) entre los elementos de una población, ya se trate de personas o patógenos, p. ej., la concentración de patógenos en una muestra, la virulencia de las cepas, la susceptibilidad de los consumidores y sus patrones de consumo, etc.

Todos los supuestos, sus bases científicas y sus implicaciones se deben plasmar en una ER, de forma que sean entendibles por el gestor de riesgos.

Los juicios de expertos incluidos en una ER, así como su grado de confianza también deben estar claramente identificados.

Aplicaciones de la caracterización del riesgo

En muchos casos, la estimación del riesgo es simplemente de interés académico. Cuando son los gestores del riesgo los que demandan una ER, con frecuencia tan sólo requieren una medida del riesgo que se pueda comparar con otro nivel de riesgo conocido, con el objetivo de priorizar estrategias y acciones de gestión. En muchas otras situaciones, un sistema se modela para evaluar la magnitud de las estrategias propuestas de reducción del riesgo. Por ejemplo: “¿una bajada de 1°C en la temperatura media de la cadena de frío reduciría el riesgo de salmonelosis en mayor proporción que la reducción de la prevalencia de *Salmonella* en un 90% en alimentos listos para consumo?”.

Como se mencionó anteriormente, a menudo es difícil obtener los datos necesarios para que una ER tenga sentido. Pese a que no se disponga de todos los datos necesarios, si se desarrolla un buen modelo, se pueden evaluar diferentes supuestos sobre el rango y distribuciones de los datos, para determinar posteriormente su importancia en la obtención de los resultados mediante un análisis de sensibilidad. Esto nos ayuda en la toma de decisiones sobre qué/cuánto invertir y priorizar en la investigación.

Análisis de sensibilidad

El análisis de sensibilidad permite determinar los efectos de los inputs (valores de las variables) sobre los resultados. Si el valor de la variable y el resultado aumentan en paralelo, o se mueven en sentidos opuestos, sugiere que el valor de la variable afecta al resultado de forma importante, y por lo tanto constituye un factor crítico en la determinación del resultado. Los análisis de sensibilidad son una herramienta dentro del software de simulación para identificar aquellas variables del modelo que más afectan al riesgo, e identificarlas como objetivos potenciales de control y gestión. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que la sensibilidad del modelo puede verse afectada por el rango de valores que una variable toma en el modelo; es decir, un factor puede ser juzgado como poco importante simplemente porque posee poca variación. Por ejemplo, si se supone un caso concreto en el que la temperatura, factor muy destacado en el crecimiento de patógenos, y como consecuencia, en la estimación del riesgo, se controlara muy bien dentro de un margen estrecho, la variable no tendría un papel tan importante.

Análisis de escenarios

Un análisis de escenarios identifica combinaciones de variables independientes que conducen a niveles diana de la/s variable/s dependiente/s, es decir, intenta identificar grupos de inputs que resultan en ciertos outputs. Este análisis se puede emplear para identificar combinaciones favorables o no favorables de factores, y como soporte en el desarrollo de estrategias de gestión.

1.3.6.5. Validación del modelo

Hasta la presente, no ha sido posible desarrollar modelos de ER para la seguridad alimentaria sin asumir ciertos supuestos, dado que actualmente no se dispone de ciertos datos, y de otros probablemente jamás se dispondrá. Algunos supuestos tienen poco efecto sobre el resultado, mientras otros son verdaderamente importantes y necesitarán ser reemplazados por datos. Surge la necesidad de un “control de calidad” o proceso de validación, antes de que los resultados de la ER se consideren como válidos y puedan ser usados.

Un modelo pragmático consistiría en hacer una simple “comprobación con la realidad”, es decir, hacer que las predicciones del modelo de simulación concuerden con los datos disponibles y la experiencia que se tenga. Se precisa desarrollar otras técnicas más sofisticadas para evaluar y diferenciar los efectos de la variabilidad e incertidumbre de los resultados de la ER, especialmente si no se dispone de datos para verificar las predicciones del modelo.

1.3.7. HERRAMIENTAS PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO

En la actualidad existen varios esquemas que facilitan las ER. A continuación se presentan dos:

1.3.7.1. Esquemas cualitativos

Existen varios esquemas cualitativos (p. ej., Corlett y Pierson, 1992; NACMCF, 1992) para la ER que se desarrollaron en el contexto del APPCC. En estos esquemas, las características de los peligros y los factores que contribuyen al riesgo se establecen mediante respuestas sí/no a unas cuestiones concretas, y el número de respuestas positivas a las cuestiones determina el ranking de riesgos. Huss y col. (2000) adoptaron este esquema, que se muestra a continuación como ejemplo. El riesgo de enfermedad

alimentaria se determinaría por el número de respuestas positivas a las siguientes cuestiones:

- ¿Existe evidencia epidemiológica de que un grupo específico de alimentos haya estado asociado a una enfermedad alimentaria en muchas ocasiones, o bien que la enfermedad sea muy grave?

- ¿No incluye el proceso de producción algún punto de control crítico para, al menos, un peligro identificado?

- ¿Está el producto sujeto a una recontaminación potencial después del proceso y antes de su empaquetado/embalaje?

- ¿Podría existir manipulación excesiva durante la distribución o a nivel de consumidor que pudiera dar lugar a un producto dañino en el momento de su consumo?

- ¿Pueden crecer potencialmente los patógenos en el producto?

- ¿No existe tratamiento térmico final tras el empaquetado/embalaje o durante la preparación del producto en casa?

Si el número de respuestas positivas es de cuatro o más, el riesgo para la combinación producto/patógeno en cuestión se considera alto. Para menos de cuatro positivas se considera riesgo bajo.

Se detectan una serie de deficiencias en este tipo de esquemas cuando se usan para evaluar el riesgo; en primer lugar, no se identifica ni probabilidad ni severidad; en segundo lugar, debido a la simplicidad del esquema, no discrimina bien entre diferentes niveles y fuentes de riesgo. Por ejemplo, la severidad y la probabilidad de la enfermedad y/o la exposición (sugerida por los datos epidemiológicos) se combinan en una sola cuestión (la primera cuestión). Una dificultad adicional para responder a la misma cuestión es que la severidad depende de la susceptibilidad del hospedador. Finalmente, sólo se predicen dos niveles de riesgo, lo que proporciona un soporte muy débil para la toma de decisiones; el riesgo es un continuo. Además, el esquema adolece de ciertas consideraciones importantes en la ER como es la probabilidad de contaminación o el volumen de producto consumido.

Estos esquemas, en algunos casos, llevan a estimaciones de riesgos no muy certeras. Dado que todas las preguntas tienen la misma importancia, las conclusiones pueden ser incongruentes. Por ejemplo, está muy bien documentado la asociación ostras-virus entéricos; sin embargo, usando el

esquema anterior, la puntuación que se obtendría es: ++---+, lo que resultaría en un riesgo muy bajo.

Por todo esto, lo que se pretende con estos esquemas es, principalmente, determinar si el peligro microbiológico percibido debería considerarse en un plan APPCC, más que determinar si existe un riesgo inaceptable.

1.3.7.2. Esquemas semi-cuantitativos

Ross y Summer (2002) desarrollaron una herramienta de cálculo del riesgo basado en el esquema descrito en el apartado anterior, para asistir al asesor o gestor del riesgo en la estimación de riesgos relativos a varias combinaciones producto-patógeno-proceso. Esta herramienta constituye un soporte para gestores del riesgo y otros interesados con escasa experiencia en el modelado del riesgo, que estima el riesgo relativo. Tiene la ventaja de que es simple, genérico y robusto, e incluye todos los factores que pueden tener efecto sobre los riesgos alimentarios, siendo además consistente con el desarrollo de la ER descrito anteriormente. El modelo se presenta en un software que funciona con hoja de cálculo.

El modelo ofrece 11 preguntas a las que el usuario debe responder seleccionando un descriptor-respuesta de los posibles que ofrece el programa. Estas 11 preguntas abarcan 3 áreas determinantes en una ER: i) susceptibilidad de la población y severidad del peligro, ii) probabilidad de exposición al alimento; y iii) probabilidad de que el alimento contenga una dosis infecciosa. Además, en algunos campos, el usuario puede introducir valores numéricos que considere oportuno (p. ej., número de personas de la población objeto de estudio).

El modelo matemático que subyace traduce dichos descriptores, usando relaciones matemáticas relativamente simples, en una serie de estimaciones del riesgo.

Este esquema permite visualizar los principales factores que contribuyen al riesgo de las enfermedades alimentarias, y se puede usar para explorar el efecto de diferentes estrategias de reducción del riesgo. No obstante, el usuario debe tener en cuenta que muchos de los descriptores tienen asignados un “peso” arbitrariamente, y que la estimación resultante de estas opciones de gestión depende de los supuestos en los que el modelo se ha basado. No así, se pueden modificar los “pesos” si se dispone de datos que indiquen una nueva asignación de “pesos” más apropiada.

Este esquema es un preámbulo y constituye una ayuda, no un modelo definitivo. Admite críticas en varios campos, pero contiene todos los elementos requeridos en una ER en alimentos y puede modificarse para adecuar las cuestiones específicas del asesor o gestor de riesgos.

1.4. COMUNICACIÓN DEL RIESGO

El objetivo de la Comunicación del riesgo se puede resumir sucintamente como “producir el nivel apropiado de preocupación y acción” (Minnesota Extension Service, 1990). Pero, ¿qué factores pueden producir preocupación?, ¿qué acciones se pueden llevar a cabo para disminuir la preocupación?, ¿qué significa “apropiado” cuando se ponderan preocupaciones y acciones? Las respuestas a estas preguntas variarán dependiendo de los distintos puntos de vista de las personas.

Como se dijo anteriormente en el apartado *1.1.1. Riesgo y percepción del riesgo*, los expertos y no expertos perciben el riesgo de forma diferente. Es necesario mostrar hechos fáciles de entender que ayuden a comprender la dimensión real de los riesgos. La Tabla 1.5 es un recurso didáctico que muestra el riesgo de muerte producida por distintas causas (Morris y Bate, 1999).

Tabla 1.5: Riesgo numérico de muerte por varias causas.

Causa de muerte	Riesgo de muerte
Fumar 10 cigarros al día	1 entre 200
Causas naturales a la edad de 40 años	1 entre 850
Violencia o envenenamiento	1 entre 3.300
Gripe	1 entre 5.000
Accidente en carretera	1 entre 8.000
Accidente casero	1 entre 26.000
Accidente laboral	1 entre 43.500
Radiación en una industria	1 entre 57.000
Homicidio	1 entre 100.000
Salmonelosis por consumo de pollo	1 entre 5.000.000
Alcanzado por un relámpago	1 entre 10.000.000
Escape radiactivo de una estación nuclear	1 entre 10.000.000

Los tres componentes de la comunicación (Mitchell, 2002) son: audiencia, mensaje y medio de comunicación. Se deben examinar cuidadosamente los tres componentes para que la comunicación sea efectiva.

La FAO/WHO (1998) define Comunicación del Riesgo como el intercambio interactivo de información y opiniones respecto al riesgo y los factores asociados al riesgo, entre los responsables de la Evaluación del Riesgo, Gestión del Riesgo, consumidores y otras partes interesadas. Además,

ha sido descrita como un elemento que integra procesos y procedimientos que:

- engloban e informan a todas las partes interesadas del proceso de análisis de riesgo;
- ayuda al desarrollo de procesos de toma de decisiones transparentes y creíbles;
- infunde confianza en la Gestión del Riesgo asociado a alimentos.

Según FAO/WHO, los objetivos de la Comunicación de Riesgos son:

- 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 Análisis de Riesgos;
- 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 se exponen 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 Evaluación y Gestión del Riesgo.
- Es necesario que un proceso de Evaluación del Riesgo 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 Evaluación del Riesgo 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. Es decir, 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 la transparencia, facilitar la consistencia y mejorar los procesos de Gestión del Riesgo. 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.

FAO/WHO (1998) también hace una recopilación de procedimientos para un proceso de comunicación efectiva, que son divididos en 3 categorías: preparación y ensamblaje; diseminación y distribución; revisión y evaluación. Su contenido dependerá de que la estrategia de Comunicación del Riesgo esté orientada a una situación rutinaria o de crisis.

FAO/WHO (1998) resalta algunos aspectos clave para una correcta Comunicación del Riesgo:

- 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.

A nivel de la Unión Europea, el Reglamento (CE) N° 178/2002 establece en su *Artículo 40. Comunicaciones de la Autoridad* que «La Autoridad

colaborará estrechamente con la Comisión y los Estados miembros para fomentar la coherencia necesaria en el proceso de comunicación de riesgos».

Existen estudios en los que se ha comprobado la efectividad de los mensajes de Comunicación del riesgo. Por ejemplo, Vaz y col. (2005) analizó la efectividad de cursos de higiene alimentaria para carniceros, obteniendo una reacción positiva, es decir, consiguiendo un mayor grado de higiene, sobre en todo en lo referido a la manipulación higiénica y limpieza y desinfección de superficies y utensilios. Con respecto a *L. monocytogenes*, Walls (2005) propone un árbol de decisión para planificar mensajes educativos para el control de *L. monocytogenes*.

CAPÍTULO 2. *LISTERIA MONOCYTOGENES*

2.1. INTRODUCCIÓN

El reconocimiento de *Listeria monocytogenes* como patógeno alimentario tuvo lugar a principios de 1980, cuando los brotes de listeriosis demostraron la naturaleza severa de la enfermedad con niveles de mortalidad excepcionalmente altos, entre el 20 y el 40% (McLauchlin, 1993; Rocourt, 1994), particularmente en los individuos más vulnerables de la población, tales como fetos, ancianos e inmunodeprimidos.

L. monocytogenes está ampliamente distribuido en el medio ambiente y potencialmente puede contaminar casi todas las materias primas. Se reconoce que su presencia en las materias primas no se puede eliminar completamente, pero es posible reducir su incidencia y concentración en alimentos a través de medidas de higiene efectivas (Codex Alimentarius, 1996).

En la actualidad se distinguen seis especies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. grayi*. Se han propuesto dos subespecies de *L. ivanovii*; *L. ivanovii* subespecie *ivanovii* y *L. ivanovii* subespecie *londoniensis* (Boerlin y col., 1992). La Tabla 2.1 muestra los tests convencionales usados en la diferenciación de *Listeria* spp. Las especies más comunes en alimentos son *L. innocua* y *L. monocytogenes* (Jay, 1996; Kozak y col., 1996).

Tabla 2.1. Tests convencionales empleados para la diferenciación de *Listeria* spp.

Especies	B-hemólisis	Producción de ácido desde:			Reacción CAMP con:	
		L-ramnosa	D-xilosa	D-manitol	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+ (algunas cepas -)	-	-	+	- (algunas cepas +)
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	++	-	+	-	-	++
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	-	(+)	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	+	-	-

++ Reacción positiva fuerte

+ Reacción positiva

(+) Reacción positiva débil

- Reacción negativa

V Reacción variable en distintos aislamientos

Fuente: adaptado de Bell y Kyriakides (2000)

L. monocytogenes es el principal patógeno para humanos del género *Listeria* (Jones, 1990). La caracterización de *L. monocytogenes* más allá del nivel de especie se ha venido haciendo hasta hace poco mediante el serotipado y el fagotipado. El serotipado ha demostrado la existencia de 13 serovariedades que puede provocar enfermedad, pero el 95% de los aislamientos en humanos pertenecen a 3 serovariedades: 1/2a, 1/2b y 4b.

El serotipado es una técnica que no diferencia bien; por ello se idearon los sistemas de fagotipado, que eran los únicos capaces de diferenciar las cepas de la misma serovariedad antes de que se comenzasen a utilizar los métodos de tipado molecular. Estos últimos tienen la ventaja de tipar todas las cepas y de no requerir reactivos especializados; sin embargo, en la actualidad no son apropiados para las pruebas de rutina. Algunos de los métodos de tipado molecular incluyen la electroforesis de los enzimas multiloculares, el ibotipado, el análisis del perfil de la microrestricción (usando enzimas de incisión de alta frecuencia y electroforesis convencional) y la macrorrestricción (usando raras enzimas de incisión y gel de electroforesis de campo pulsado) del DNA, y la ampliación al azar del DNA polimórfico (Mazurier y Wernars, 1992; Buchrieser y col., 1993; Graves y col., 1994).

Desde 1981, las cepas de la serovariedad 4b son responsables del 33 al 50% de casos esporádicos en todo el mundo y de los brotes principales producidos por alimentos. En contraposición, los aislamientos recuperados de los alimentos en numerosos países pertenecen en su mayor parte al serogrupo 1/2. El análisis por electroforesis de los enzimas multiloculares y ribotipado ha dado como resultado una clasificación de las cepas en dos grupos, cada uno de los cuales contiene dos serovariedades: i) el integrado por la serovariedad mayoritaria 4b y por las cepas 1/2b de origen humano, y el integrado por las cepas 1/2a y por las cepas 1/2c, procedentes principalmente de alimentos y del ambiente (Boerlin y Piffaretti, 1991; Graves y col., 1994). El significado de esta observación sigue sin estar muy clara.

Existe controversia a la hora de establecer si se ha de tener en cuenta los serotipos de *L. monocytogenes* que se identifican en alimentos o plantas industriales, etc. Rocourt y Cossart (2001) sostienen que, desde el punto de vista de la Evaluación del Riesgo, el potencial de los serogrupos de *L. monocytogenes* para causar listeriosis constituye un elemento a tener en cuenta por las autoridades nacionales sanitarias; sin embargo McLauchlin (1997), en una revisión detallada de la patogenicidad de *L. monocytogenes*, concluyó que «por razones de salud pública, todos los resultados positivos

para *L. monocytogenes*, incluyendo aquellos procedentes de alimentos, deben considerarse como potencialmente patógenos». De hecho, a este respecto, cabe decir que en las legislaciones alimentarias donde se contempla *L. monocytogenes*, no aparece ninguna subdivisión de la especie, como serotipado, etc.

2.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN

Los laboratorios de industrias alimentarias utilizan normalmente métodos convencionales para la detección e identificación de *Listeria monocytogenes*. Los tests de ausencia/presencia (detección) en 25 g son los más comúnmente utilizados en alimentos, pero también se realizan recuentos por gramo.

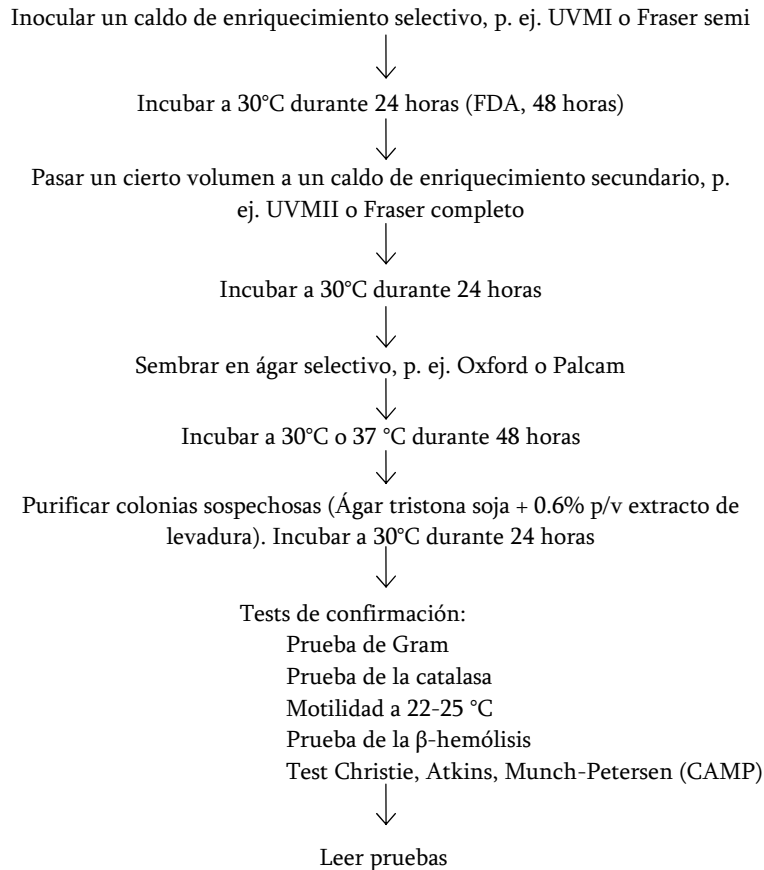


Figura 2.1. Secuencia de pasos para la investigación de *L. monocytogenes* en un análisis convencional.

La Figura 2.1 indica la secuencia de pasos de los métodos convencionales empleados por los microbiólogos de alimentos para aislar e identificar *Listeria monocytogenes*. El Reglamento (CE) N° 2073/2005 recomienda los métodos ISO 11290-1 y 11290-2 para la investigación y el recuento de *L. monocytogenes*, respectivamente, basados en métodos convencionales.

Además de estos métodos, existen otras técnicas alternativas para la detección e identificación en alimentos. Cuando los resultados obtenidos sean positivos, puede ser necesario efectuar análisis posteriores para caracterizar el organismo, como pueden ser serotipado, producción de listeriocinas y su habilidad para inhibir el crecimiento de cepas indicadoras seleccionadas, ribotipado y electroforesis en gel con pulsos eléctricos.

En la Tabla 2.2 se enumeran algunos métodos alternativos para la detección y/o identificación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. Para obtener una lista más extensa, véase Baylis (2000).

Tabla 2.2. Algunos métodos para la detección y/o identificación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en alimentos.

Técnica/Tipo de test	Nombre del test	Resultado/Tiempo aproximado	Proveedor
Kits de pruebas bioquímicas miniaturizados	API <i>Listeria</i>	Confirmación e identificación de una colonia aislada/ 6 días	bioMérieux UK Ltd
	Microbat 12L <i>Listeria</i>		Microgen Bioproductos Ltd
	MicroID		Organon Teknika Ltd
Test de screening enzimático	Key ID <i>Listeria</i>	Presuntivo/ 4 días	LabM
Inmunoensayo fluorescente con enzima ligado	VIDAS <i>Listeria</i>	Presuntivo/ 48 horas	bioMérieux UK Ltd
	VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i>		
Test ELISA (inmunosorbente con enzimaligado)	Transia plate <i>Listeria monocytogenes</i>	Presuntivo/ 50 horas	Diffchamb
	<i>Listeria</i> – Tek		Organon- Teknika
	Tecra <i>Listeria</i> Visual immnoassay		Tecra Diagnostics
Inmuno- cromatografía	Clearview <i>Listeria</i>	Presuntivo/ 43 horas	Oxoid Ltd.
	Reveal for <i>Listeria</i>		Neogen Corp.
Sondas de hibridación de ácidos nucleicos	Gene Trak test for <i>Listeria</i> spp.	Confirmativo/ 50 horas	Gene Trak Systems
	Gene Trak test for <i>Listeria monocytogenes</i>		
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	BAX™ for screening <i>L. monocytogenes</i>	Confirmativo/ 48 horas	Qualicon
	Foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i>		Biotecon Diagnostics
	PROBELIA™ <i>Listeria monocytogenes</i>		Sanofi Diagnostics, Pasteur

2.3. CARACTERÍSTICAS Y ECOLOGÍA

L. monocytogenes es un bacilo Gram-positivo, anaeróbico facultativo, no forma esporos, y presenta una motilidad típica a 20-25°C, pero no a 35°C.

L. monocytogenes posee dos propiedades que contribuyen especialmente a su amplia diseminación en el medio ambiente: i) a pesar de no formar esporas, es capaz de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en muchos medios diferentes; y ii) es un organismo psicrotrofo. Por consiguiente, el alimento se puede contaminar en cualquier eslabón de la cadena “de la huerta a la mesa” del alimento, y el almacenamiento en frío no inhibe su crecimiento. A continuación se exponen los principales factores que afectan al crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes es capaz de crecer a **temperaturas** de refrigeración, normalmente 0-8°C, si bien a estas temperaturas crece lentamente. Además, puede sobrevivir durante varias semanas en muchos tipos de alimentos congelados aunque la supervivencia será menor en productos que presenten un pH inferior al óptimo para el microorganismo (ICMSF, 1998). La Tabla 2.3 muestra los límites para el crecimiento, mínimos y máximos, de la temperatura, pH y Aw.

Tabla 2.3. Parámetros que limitan el crecimiento de *L. monocytogenes* (adaptado de ICMSF, 1998).

Parámetro	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	-0,4	45
pH	4,39	9,4
Aw	0,92	-

L. monocytogenes no es un microorganismo muy termorresistente, y un proceso de cocción controlado adecuadamente, conseguirá importantes reducciones en el número de microorganismos. La Tabla 2.4 muestra combinaciones tiempo-temperatura para conseguir una reducción del microorganismo de 10⁶.

Para productos en los cuales el **pH** alcanza valores no óptimos de pH (normalmente ácidos) bien como resultado del proceso de elaboración (p. ej. el queso o los productos cárnicos fermentados) o bien por la adición directa y mezcla con una sustancia ácida (p. ej. un aliño que contenga aceite y vinagre), el pH contribuirá al control del crecimiento de la población bacteriana incluyendo a cualquier *Listeria* spp. que pueda estar presente.

Tabla 2.4: Guía de las combinaciones tiempo-temperatura necesarias para conseguir una reducción de *L. monocytogenes* de 10^6 (Bell y Kyriakides, 2000).

Temperatura (°C)	Tiempo
60	45 min
65	10 min
70	2 min
75	30 s
80	5 s
85	1 s

Cuando se utilizan los ácidos orgánicos (acético, láctico, cítrico, propiónico, etc.) como conservantes en los alimentos, es importante asegurarse que la concentración correcta de la forma no disociada del ácido (que es la responsable de la actividad antimicrobiana) esté disponible para inhibir el crecimiento bacteriano. La proporción de ácido no disociado presente varía con el pH; en consecuencia, esto debe tenerse en cuenta a la hora de determinar la cantidad total de ácido requerida a un determinado pH para dar lugar a una concentración concreta de la forma no disociada del ácido. A pH neutro, la mayoría de los ácidos orgánicos tienen un efecto limitado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*. La Tabla 2.5 muestra el porcentaje de forma no disociada de varios ácidos orgánicos a distintos pHs.

Tabla 2.5. Ejemplos del porcentaje total de ácido orgánico no disociado presente a diferentes valores de pH (adaptado de ICMSF, 1980).

Ácido orgánico	Valor de pH			
	4	5	6	7
Ácido acético	84.5	34.9	5.1	0.54
Ácido cítrico	18.9	0.41	0.006	< 0.001
Ácido láctico	39.2	6.05	0.64	0.064

Dado estos porcentajes, el ácido acético posee un efecto inhibitor más marcado que los ácidos cítrico y láctico.

La adición a un alimento de cloruro sódico, azúcares y/u otros solutos disminuye su **actividad de agua** (A_w). Cuanto mayor sea la concentración del soluto, menor será la A_w . *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir en presencia de niveles elevados de cloruro sódico (30%). Para alimentos en los que su A_w sea próxima o inferior a la mínima para el crecimiento de *L. monocytogenes*, este puede prevenirse o minimizarse evitando que la A_w del producto aumente durante la vida o el uso del mismo (p. ej. mezclándolo con otros alimentos de mayor A_w o permitiendo que se forme condensación en el

producto). El efecto bacteriostático ejercido por las bajas A_w sobre *L. monocytogenes* se incrementa mediante el uso del almacenamiento en frío de los alimentos (ICMSF, 1998).

La combinación de condiciones físico-químicas subóptimas, tales como pH, temperatura y A_w tiene normalmente un efecto mayor que el que ejercen cualesquiera de los factores individuales utilizados al mismo nivel (ICMSF, 1998).

La Tabla 2.6 recoge algunos factores físico-químicos adicionales utilizados en la industria alimentaria para controlar a *L. monocytogenes*.

Tabla 2.6. Comentarios sobre la aplicación de algunos factores para controlar a *L. monocytogenes*

Parámetro	Comentarios	Referencias
Atmósferas modificadas	Alteraciones de la atmósfera en la cual se envasa el producto, p. ej. envasado al vacío para crear anaerobiosis, aumentar el dióxido de carbono, no inhiben por completo el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> pero pueden alargar la fase de adaptación y el tiempo de generación	(ICMSF, 1998)
Irradiación con rayos gamma	El microorganismo muestra una resistencia similar a las radiaciones gamma a la que presenta otras bacterias Gram-positivas y se requieren dosis > 3 KG para eliminar a este microorganismo de productos cárnicos	(ICMSF, 1998)
Nisina y otras bacteriocinas	La nisina y otras bacteriocinas producidas por bacterias acidolácticas están siendo examinadas por su efecto inhibitorio sobre <i>L. monocytogenes</i> . Los resultados obtenidos de los trabajos publicados hasta la fecha señalan la utilidad de las bacteriocinas para controlar el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en los alimentos	(Dean y Zottola, 1996)
Nitrito sódico	A las concentraciones que están permitidas en los alimentos, el nitrito no previene el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> , por lo que sobrevive a dichas concentraciones	(Doyle, 1988)

Todavía se está llevando a cabo una considerable cantidad de trabajo en todo el mundo para determinar los efectos de los procesos actuales y nuevos en la industria alimentaria, incluyendo los efectos individuales y combinados sobre el crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes* en los alimentos (Abee y col., 1994; Phan-Thanh y col., 2000; King y col., 2003; Beuchat y col., 2004; Park y col., 2004; Kim y col., 2006). Será a partir de este conocimiento cuando se asigne un tiempo de conservación del producto adecuado para

prevenir un crecimiento de *L. monocytogenes* en caso de encontrarse presente en el alimento.

2.4. RESERVORIOS

Los reservorios de *L. monocytogenes* pueden dividirse en: ambiente, plantas de tratamiento de alimentos, alimentos, y población humana.

2.4.1. AMBIENTE

L. monocytogenes se ha aislado en varios ambientes durante décadas: el papel del ensilado en la transmisión de la enfermedad animal fue documentado bacteriológicamente en 1960, y se aislaron cepas en vegetación natural en putrefacción en 1968 (Weis y Seeliger, 1975; Husu y col., 1990b). La bacteria es capaz de sobrevivir y crecer en la tierra y agua. Se han detectado especies de *Listeria* en varios medios acuáticos: agua de la superficie de canales y lagos, zanjas y terrenos ganados al mar en Holanda, efluentes de agua dulce que desembocan en una bahía de California, y aguas residuales (Dijkstra, 1982; Geuenich y col., 1985; Colburn y col., 1990). Se ha descubierto la contaminación por *Listeria* en plantas de alfalfa y otras cosechas cultivadas en tierra tratada con lodo de aguas residuales (Alghazali y Alazawi, 1990). Igualmente, se ha documentado varias veces la presencia de *L. monocytogenes* en la hierba de los pastos y en los ensilados de hierba (Husu y col., 1990b).

2.4.2. PLANTAS DE PROCESADO DE ALIMENTOS

La entrada de *L. monocytogenes* en las plantas de tratamiento de alimentos ocurre por medio de la tierra existente en los zapatos y en la vestimenta de los obreros y en el equipo de transporte, por medio de los animales que excretan la bacteria o tienen la piel o la superficie corporal contaminada, por medio de los tejidos vegetales crudos, de los alimentos crudos de origen animal, y posiblemente a través de portadores humanos sanos. El crecimiento de las "listerias" es favorecido por la humedad elevada en presencia de nutrientes. *L. monocytogenes* se ha detectado a menudo en zonas húmedas, p. ej., en los sumideros de los pavimentos, en el agua condensada y estancada, en los residuos y en equipos de tratamiento (Cox y col., 1989). *L. monocytogenes* es capaz de adherirse a varios tipos de superficies (incluyendo el acero inoxidable, el vidrio, y el caucho), se han encontrado biofilms en la carne y en las plantas de tratamiento de productos lácteos (Jeong y Frank, 1994). Las listerias sobreviven en los dedos después del lavado de manos y en los aerosoles. Los efluentes contaminados de las plantas de tratamiento de alimentos favorecen la difusión de *L. monocytogenes* en el ambiente.

2.4.3. ALIMENTOS

En la Unión Europea, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es la autoridad competente para recopilar y analizar datos científicos, identificar riesgos emergentes y proveer apoyo científico a la Comisión, especialmente en caso de crisis alimentarias, según lo dispuesto en el Reglamento (CE) N° 178/2002. Asimismo, y en cumplimiento con la Directiva 2003/99/EC, incorporada a la legislación española mediante el Real Decreto 1940/2004 de 27 de septiembre, EFSA es la autoridad responsable del análisis de datos procedentes de zoonosis, resistencia antimicrobiana y brotes alimentarios recopilados por los Estados Miembros; con esta información, EFSA elabora anualmente un informe que para el año 2004 recibe el nombre de “Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004” (EFSA, 2006b).

Tabla 2.7. *L. monocytogenes* en alimentos en 2003 y 2004 basado en resultados positivos del patógeno en 21 Países Miembros y Noruega.

Alimento	Resultados positivos (%)	Resultados positivos (%)
	2004	2003
Productos de vacuno, listo para consumo	0-48,6%	0-10,7%
Productos del cerdo, listo para consumo	0-27,6%	0-6,1%
Otras carnes, listo para consumo	0-29,1%	0-21,5%
Productos de pollería, listo para consumo	0-40%	0-32,3%
Quesos	0-12,5%	0-4,8%
Leche cruda	0-100%	0-0,3%
Productos lácteos, listos para consumo	0-0,6%	-
Productos de la pesca	0-29,8%	0-13,2%
Frutas y vegetales	0-33,3%	0-1,3%

En dicho informe, se muestra, entre otros, el rango de resultados positivos en investigaciones de *L. monocytogenes* en alimentos (Tabla 2.7), así como el porcentaje de muestras positivas en distintos grupos de alimentos.

En relación al porcentaje de muestras positivas en distintos grupos de alimentos, se muestra en la Tabla 2.8 los correspondientes a España en el año

2004; estos datos proceden del informe que España, junto con los demás Países Miembros, ha de elaborar y enviar a EFSA para que ésta elabore el informe mencionado anteriormente, todo ello en cumplimiento del Reglamento (CE) N° 178/2002 y la Directiva 2003/99/EC.

Con todo lo expuesto, se concluye que *L. monocytogenes* se encuentra en una gran variedad de alimentos tanto frescos como procesados. Una investigación del Servicio de Laboratorio de Salud Pública de Londres (Inglaterra), indicó que el 6% de 18.000 muestras de alimentos estaban contaminadas con *L. monocytogenes* y que el 5% de las muestras positivas contenían más de 1000 ufc/g (McLauchlin y Gilbert, 1990). En otra investigación, el 11% de las muestras de alimentos de los frigoríficos de enfermos que padecían listeriosis en Estados Unidos fue positivo a *L. monocytogenes*, y el 10% de las muestras positivas contenía más de 100 ufc/g (Pinner y col., 1992).

La leche y los productos lácteos fueron los primeros alimentos investigados, constituyendo el grupo de alimentos del que más bibliografía se dispone. *L. monocytogenes* se ha identificado en el 2-5% aproximadamente de las muestras de leche fresca en tanques a granel, sin tendencias estacionales evidentes (Lovett y col., 1987). El posible origen de la contaminación exógena incluye los piensos (que pueden contener hasta 10^5 ufc/g), la eliminación fecal por vacas portadoras sanas, y las dependencias de granja (Husu y col., 1990a). Los casos de vacas con mastitis por *L. monocytogenes* son raros, pero en tales casos se pueden excretar hasta 10^5 ufc/ml de leche. Las poblaciones detectadas de *L. monocytogenes* en la leche fresca de tanques a granel son habitualmente bajas (<1 a 10 ufc/ml). También los quesos son susceptibles de contaminación, especialmente los quesos blandos, con una frecuencia de contaminación del 2 al 10% aproximadamente, y en los que las poblaciones de *L. monocytogenes* varían desde 10 hasta 10^7 ufc/g. Los quesos blandos tienen un pH que permite el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta alcanzar niveles importantes. Existe una correlación significativa entre el crecimiento de *L. monocytogenes* en queso y los valores de pH > 5,5. El helado se contamina frecuentemente con *L. monocytogenes* (desde el 0,3 hasta el 2% de las muestras analizadas) y, cuando se hallan presentes, las poblaciones generalmente son bajas (<1 ufc/g) (Genigeorgis y col., 1991). Por otro lado, el yogur (los cultivos lácticos termófilos inhiben el crecimiento de *Listeria*) y la mantequilla rara vez están contaminados.

Tabla 2.8. *L. monocytogenes* en alimentos en España durante 2004.

	Fuente de información	Comentarios	Peso de la muestra	Definición usada	Nº unidades	<100 ufc/g	>100 ufc/g	<i>L.monocytogenes</i>
Carne de vacuno								
Productos cárnicos								
Listo para consumo								
-En la planta de procesado	BEF			¹ Pres	64			19
Fresco	ABC		25g	Pres/>100	82			
Carne de cerdo								
Productos cárnicos								
Listo para consumo								
-En la planta de procesado	ABCEF	0	25g	Pres>100	676			36
Fresco	ABC		25g	Pres/>100	118			2
Pollería								
Productos cárnicos								
Listo para consumo								
-En la planta de procesado	ABEF	0	25g	Pres	37			6
Fresco	AB		25g	Pres/>100	187			15
Otras carnes								
Productos cárnicos								
Listo para consumo								
-En la planta de procesado	ABE		25g	Pres	15			
Carne picada	ABC		25g/250 g	Pres/10/>100	361			62
Fresco	ABC		25g	Presión	29			
Productos lácteos								
Helados	AB		25g/250g	Pres	266			3
Productos lácteos no especificados	ABCDEF		25g/250g	Pres/10/>100	1784			39
Productos de la pesca								
Pescado	ABCEF		1g/25g	Pres/10/>100	748			52
Ahumado								
-En la planta de procesado	D	0	0	0	0			0
Productos del huevo	A		25g	Pres/>100	34			
Vegetales	ABE		25g	Pres/>100	143			7
Comidas preparadas	ABCE		25g/350g	Pres/10/>100	4057			87
Alimentos no especificados	ABC		25g	Pres/>100	201			8

¹Presencia.

(A) Monitorización obligatoria; (B) Programas de monitorización voluntaria; (C) Encuestas; (D) Otros procedimientos de muestreo; (E) Informes laboratoriales; (F) Laboratorio Nacional de Referencia.

Una variedad considerable de carnes y productos cárnicos se ha relacionado con la contaminación por *L. monocytogenes*, incluyendo la carne de vaca, la carne de cerdo, la carne picada, el jamón, los embutidos ahumados y fermentados, el salami, y el paté; en la mayoría de estos casos, se trata de contaminación de superficie. El predominio de la contaminación en la carne cruda y los productos cárnicos puede ser elevado (desde <1 hasta el 70%). *L. monocytogenes* es capaz de crecer en la carne, dependiendo del pH, del tipo de tejido (magro o graso), del tipo y concentración de la microflora del producto, de la temperatura, y de los conservantes (Johnson y col., 1990). Las aves de corral (pollo tipo broiler, listo para consumo, precocinado, refrigerado, o congelado) también se encuentran contaminadas con frecuencia, con hasta el 60% de las muestras positivas en algunas investigaciones. Los niveles de *L. monocytogenes* presentes en los productos cárnicos frescos o elaborados suelen ser bajos, conteniendo desde el 80 hasta 90% de las muestras de <10 a 100 ufc/g. Sin embargo, en algunos productos listos para consumo, entre los que se incluyen los implicados en brotes de listeriosis, se han descrito poblaciones más elevadas.

L. monocytogenes se halla presente con frecuencia en hortalizas frescas (rábanos, pepinos, col, patatas), pero generalmente a niveles bajos. La mayoría de las hortalizas permiten el crecimiento del patógeno (Beuchat y Brackett, 1990a; Beuchat y Brackett, 1991). Los orígenes de la contaminación incluyen la tierra, el agua, el estiércol de los animales, la vegetación en putrefacción, y los efluentes de aguas residuales de las plantas de tratamiento.

El predominio de *L. monocytogenes* en el marisco crudo y listo para comer y en los productos derivados del pescado (especialmente en el pescado ahumado) puede ser elevado (hasta el 25%) (Farber, 1991). Se han observado niveles bajos (desde 0,2 hasta 2 ufc/g) en la langosta y en los camarones listos para consumo y en los filetes de pescado empanado congelados (<100 ufc/g), pero en el pescado ahumado se han detectado poblaciones más elevadas (hasta 10^4 ufc/g) (Farber, 1991). Las investigaciones de *L. monocytogenes* durante la producción y almacenamiento del salmón ahumado revelaron que las poblaciones de *L. monocytogenes* permanecían invariables durante el marinado y ahumado, pero durante el almacenamiento a temperaturas entre 4 y 10°C aumentaban de modo considerable (Guyer y Jemmi, 1991).

2.4.4. POBLACIÓN HUMANA

Se han realizado estudios sobre distintos sectores de la población como portadores asintomáticos de *L. monocytogenes* vía fecal. Estos sectores han

sido: mujeres embarazadas, personas sanas, enfermos que están sometidos a trasplante renal o a hemodiálisis y enfermos con síntomas de gastroenteritis. Se ha aislado el patógeno en un porcentaje entre 2-6% de las muestras fecales de personas sanas. Los enfermos de listeriosis usualmente excretan poblaciones elevadas de listerias; las muestras del 21% de los enfermos contenían $\geq 10^4$ ufc/g de heces y el 18% de las personas que vivían en el domicilio de los enfermos con listeriosis eliminaba la misma serovariedad y el mismo perfil isoenzimático de *L. monocytogenes* (Jensen, 1993; Schuchat y col., 1993). Además, los resultados de la investigación de un brote en California en 1985 revelaron que los brotes producidos en la comunidad se podrían extender mediante transmisión secundaria por portadores fecales (Mascola y col., 1992). En el análisis de muestras bucofaríngeas de personas sanas, no se ha sido aislado *L. monocytogenes*. La presencia del organismo en muestras cervicovaginales siempre está asociada al embarazo. El papel de los portadores sanos en la epidemiología de la listeriosis es dudoso, por lo que se abre la posibilidad del estudio de este hecho no constatado.

2.5. BROTES

La transmisión de la listeriosis vía alimentaria se propuso desde hace mucho tiempo en la bibliografía médica, pero fue demostrada por primera vez en 1981 durante un brote en Canadá, en el que el estudio de los casos se realizó simultáneamente con el tipado de las cepas. Desde 1981, las investigaciones epidemiológicas han indicado repetidamente que el consumo de alimentos contaminados es el vehículo principal de la transmisión de la listeriosis. La Tabla 2.9 muestra algunos ejemplos de brotes de listeriosis.

Tabla 2.9. Ejemplos de brotes alimentarios de listeriosis.

Año	País	Casos (muertes)	Alimento	Serotipo	Referencia
1980-81	Canadá	41 (18)	Ensalada de col	4b	Schlech y col. (1983)
1983	USA	49 (14)	Leche pasteurizada	4b	Fleming y col. (1985)
1983-87	Suiza	122 (34)	Queso tipo Vacherin	4b	Bille (1990)
1985	USA	142 (48)	Queso de estilo mexicano	4b	Linan y col. (1988)
1987-89	UK	>350 (>90)	Paté belga	4b	McLauchlin y col. (1991)
1992	Nueva Zelanda	4 (2)	Mejillones ahumados	1/2a	Baker y col. (1993)
1992	Francia	279 (85)	Lengua de cerdo en gelatina de carne	4b	Goulet y col. (1993)
1994	USA	45 (0)	Leche con chocolate	1/2a	Dalton y col. (1997)
1995	Francia	20 (4)	Queso blando	4b	Goulet y col. (1995)
1997	Italia	>1500 (0)	Ensalada de atún y maíz	4b	Aureli y col. (2000)
1998	USA	>50 (8)	Perritos calientes y chacinas	4b	Anon. (1999)
1998	USA	40 (4)	Perritos calientes	4b	Anon. (1998)
1998-99	Finlandia	18 (4)	Mantequilla	3a	Lyytikäinen y col. (1999)
1999-2000	Francia	26 (7)	Lengua de cerdo en gelatina	4b	Anon. (2000)

El informe de EFSA que se citó anteriormente (“Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004”) proporciona datos de interés en relación con los casos de

listeriosis; así, la Tabla 2.10 muestra los casos de listeriosis en humanos desde 1999 hasta 2004, así como la incidencia en el año 2004.

Los factores que parecen elevar el riesgo en relación al potencial de un alimento para causar listeriosis incluyen:

- Materias primas expuestas a contaminación.
- Alimentos cuyo proceso de producción no incluye una etapa que destruya al microorganismo, p. ej. cocinado.

Tabla 2.10. Casos de listeriosis en humanos, 1999-2004, e incidencia en 2004.

	2004	2004	2003	2002	2001	2000	1999
	Casos/ 100.000 habitantes	Número de casos					
Austria	0,2	19	8	16	9	14	13
Bélgica	0,7	70	78	44	57	48	64
Chipre	-	-	-	-	-	-	-
Rep. Checa	0,2	16	-	-	-	-	-
Dinamarca	0,8	41	29	28	38	39	44
Estonia	0,2	2	-	-	-	-	1
Finlandia	0,7	35	41	20	28	18	46
Francia	0,4	238	220	218	187	261	275
Alemania ¹	0,4	295	255	237	218	33	31
Grecia	<0,1	3	0	5	3	2	1
Hungría	0,2	16	-	-	-	-	-
Irlanda	0,3	11	6	6	7	7	-
Italia	<0,1	25	0	-	-	13	17
Letonia	0,2	5	8	-	31	36	-
Lituania	<0,1	1	2	-	-	-	-
Luxemburgo	-	-	-	-	-	-	-
Malta	-	-	-	-	-	-	-
Polonia	<0,1	10	-	-	-	-	-
Portugal	0,4	38	-	-	-	-	-
Eslovaquia	0,2	8	-	-	-	-	-
Eslovenia	<0,1	1	6	-	-	-	-
España ²	0,2	100	52	49	57	35	32
Suecia	0,5	44	48	39	67	46	27
Países Bajos	0,3	55	52	32	16	-	-
Reino Unido	0,4	236	243	150	156	115	116
Total UE	0,3	1.267	1.046	844	872	586	667
Noruega	0,5	21	18	17	18	-	-

¹En Alemania, los casos fueron declarados a través de un sistema revisado de recogida de datos desde 2001.

²En España sólo se notificaron los casos de hospitalización.

- Alimentos cuyas condiciones no previenen el crecimiento, p. ej., pH neutro, baja concentración de sal, humedad elevada, etc.
- Alimentos expuestos a una contaminación tras el procesado.
- Alimentos con una vida comercial elevada, y que deban permanecer en condiciones de refrigeración hasta su consumo.
- Alimentos listos para consumo.

En 2004 hubo 1.267 casos de listeriosis en la Unión Europea (UE), lo que representa una incidencia de 0,3 casos por 100.000 personas. Esta incidencia es la misma observada en 2003. Las incidencias por países varían desde 0,03 para Grecia, Lituania y Polonia hasta 0.8 para Dinamarca.

La Figura 2.2 muestra el porcentaje de aumento en la incidencia de listeriosis en el 2004 con respecto a la media de las incidencias de los 5 años anteriores, en aquellos Estados Miembros de los que se dispone de datos. Todos los Estados Miembros, con la excepción de Suecia, presentan un aumento en la incidencia de la listeriosis, siendo España el más notable.

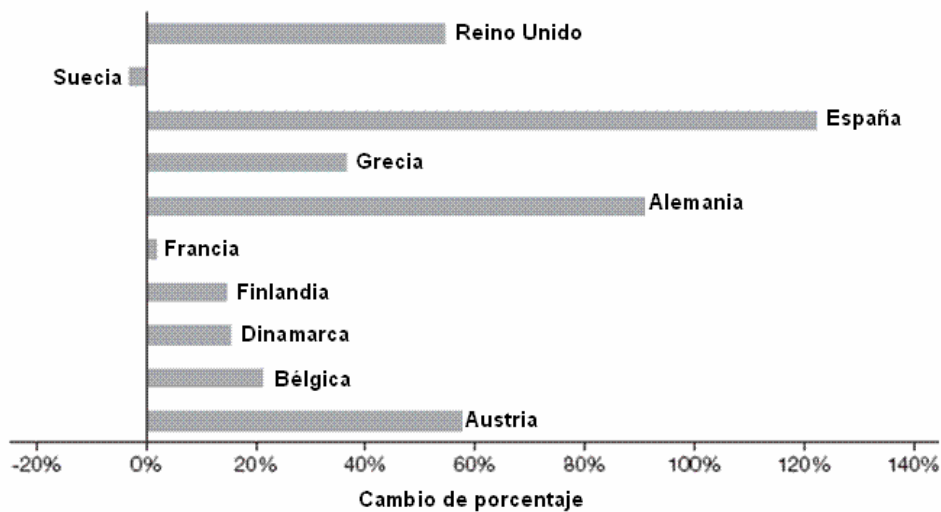


Figura 2.2. Porcentaje de cambio en la incidencia de listeriosis humana en 2004 comparado con la media de los 5 años anteriores (1999-2003).

A continuación, se muestra la distribución de los casos por edad y sexo (Figura 2.3). El 51% de los casos de listeriosis corresponde a personas mayores de 65 años. 55 casos se asociaron con el embarazo, madres e hijos, registrados en 9 países. Se han descrito un total de 107 muertes (8,3%). Normalmente la listeriosis tiene una tasa de mortalidad más alta, aunque es posible que los Países Miembros no hayan informado de todas las muertes.

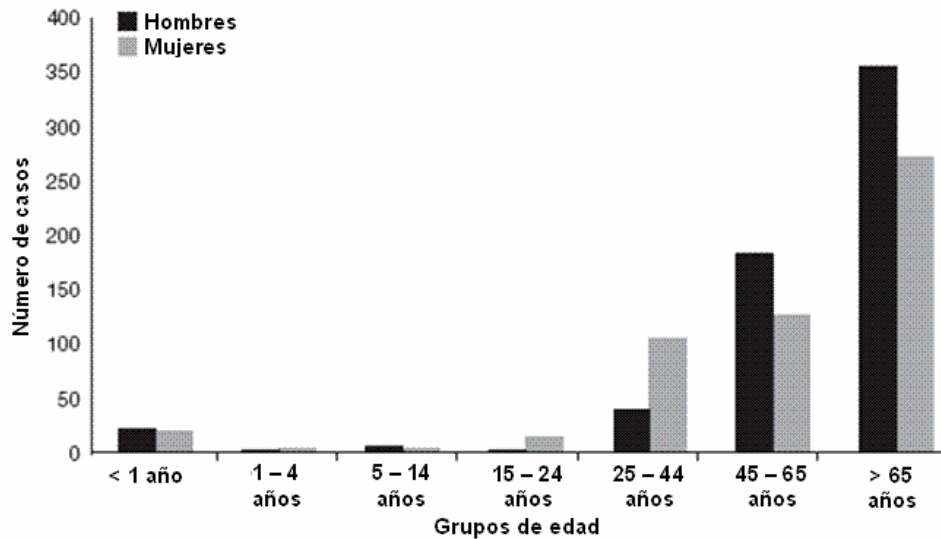


Figura 2.3. Número de casos humanos de listeriosis por edad y sexo, 2004. Unión Europea.

El informe realizado por España para su envío a EFSA (como se comentó anteriormente), muestra la siguiente distribución de los 100 casos de listeriosis documentados durante el año 2004:

Tabla 2.11. ^aCasos de listeriosis en humanos en España. Distribución por edad y sexo.

Distribución por edades	<i>L. monocytogenes</i>			<i>Listeria</i> spp		
	Todos	M	F	Todos	M	F
< 1 año	9	4	4			
1 - 4 años						
5 - 14 años						
15 - 24 años						
25 - 44 años	15	6	9			
45 - 64 años	20	17	8			
> 65 años	46	29	17			
Edad desconocida	4	1	1			
Total	100	57	39	0	0	0

^a4 casos con género desconocido

2.6. ENFERMEDAD

2.6.1. CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

La listeriosis es una enfermedad poco frecuente; se estima una frecuencia comprendida entre 2 y 7 casos por millón de personas en algunos países europeos y en Canadá, dada la información recopilada durante los últimos años mediante vigilancia pasiva. Un cálculo más exacto de 7,4 casos por millón de personas fue obtenido mediante un estudio de vigilancia activa en Estados Unidos en 1989 y 1990 en una población de 19 millones de personas. Desde 1990, en Estados Unidos se ha observado una disminución en el número de casos (44%) y en el número de muertes (48%) atribuibles a listeriosis, que indica que las medidas tomadas en la industria alimentaria y las recomendaciones para las personas con alto riesgo de contraer la enfermedad han resultado eficaces (Tappero y col., 1995).

L. monocytogenes puede causar una variedad de infecciones (Tabla 2.12), aunque la forma de listeriosis más frecuente es la que afecta al útero, torrente sanguíneo o sistema nervioso central.

Aunque la exposición a *L. monocytogenes* es frecuente, la listeriosis invasora es poco común. No se sabe con certeza si esto es debido a la protección precoz adquirida o porque la mayoría de las cepas no son muy virulentas. La patogenia de la listeriosis humana es poco conocida. Se estima que entre el 2 y el 6% de los individuos sanos es portador fecal asintomático de *L. monocytogenes*; el riesgo de enfermedad clínica en estos individuos se desconoce. Se admite que tenga lugar la infección endógena, especialmente en los enfermos que reciben terapia inmunodepresora, que debilita la resistencia a la infección y altera los mecanismos de defensa intestinal, favoreciendo la invasión de las listerias. No obstante, esto no siempre ocurre; por ejemplo, se ha observado personas que han sufrido un trasplante y albergan *L. monocytogenes* en el intestino sin manifestar síntomas de enfermedad.

Rocourt (1996) revisó los individuos que presenta mayor riesgo de contraer listeriosis, que en orden descendiente de riesgo son: pacientes que hayan sufrido un trasplante de órganos, pacientes con SIDA, individuos infectados con HIV, mujeres embarazadas, pacientes con cáncer y ancianos. Además, un porcentaje insignificante de enfermos de listeriosis padecen enfermedades crónicas generalmente no asociadas con inmunosupresión,

tales como la insuficiencia cardíaca congestiva, la diabetes, la cirrosis, el alcoholismo o el lupus eritematoso sistémico (Rocourt y Cossart, 2001).

Tabla 2.12. Tipos de enfermedad causada por *L. monocytogenes*

Tipo de enfermedad	Tiempo de incubación	Síntomas
Infección zoonótica.	1-2 días.	Lesiones cutáneas localizadas leves; se resuelve sin tratamiento.
Infección neonatal: recién nacidos infectados por su madre durante el parto o por infección cruzada de un neonato a otros bebés en el hospital.	1-2 días (incubación temprana). Usualmente en la infección congénita previa al parto.	Puede ser severo, resultando en meningitis y muerte.
Infección de la madre durante el embarazo adquirido a través de alimentos contaminados.	Varía entre 1 día hasta varios meses.	Enfermedad parecida a una gripe leve o incluso asintomático para la madre pero con serias implicaciones para el feto, incluyendo aborto espontáneo, la muerte del feto, nacimiento del bebé muerto y meningitis. La infección es más común en el tercer trimestre.
Listeriosis en personas no embarazadas a través de alimentos contaminados.	Varía entre 1 día hasta varios meses.	Asintomático o enfermedad leve que puede evolucionar hasta infecciones del sistema nervioso central, tales como la meningitis. Es más común y severa en personas ancianas o inmunodeprimidas.
Listeriosis por consumo de alimentos que contienen niveles muy altos de <i>L. monocytogenes</i> (>10 ⁷ ufc/g).	<24 horas tras el consumo.	Vómitos y diarrea, algunas veces progresa hacia bacteriemia, pero normalmente se resuelve sin tratamiento.

Fuente: adaptado de Bell y Kyriakides (2000)

El porcentaje general de los casos de muerte correspondiente a la listeriosis sistémica o invasora suele ser de un 20–30% aproximadamente tanto en los casos epidémicos como en los esporádicos. El pronóstico de la listeriosis depende tanto del tiempo de incubación como de los síntomas. La mortalidad suele ser más elevada (38 a 40%) en las personas mayores enfermas inmunodeprimidas y en los enfermos que padecen infecciones del sistema nervioso central.

2.6.2. DOSIS INFECCIOSA Y PATOGENIA

La dosis infecciosa de *L. monocytogenes* depende de varios factores, que incluyen el estado inmunológico del hospedador y las características

microbianas. Las investigaciones en monos y ratones indican que la reducción de los niveles de exposición reduciría la aparición de la enfermedad clínica (Farber y col., 1991). Sin embargo, estos experimentos no ayudan a determinar la dosis infecciosa mínima en las personas. Los datos publicados indican que las cantidades de *L. monocytogenes* en el alimento contaminado responsable de casos esporádicos de origen alimentario eran superiores a 100 ufc/g (SCVPH, 1999; Rocourt y Cossart, 2001). No obstante, se ha de tener en cuenta que los resultados en los que se basa este supuesto no siempre se corresponden de forma fidedigna con la cantidad de listerias ingeridas, debido principalmente a que las técnicas de recuento no siempre son fiables y a la multiplicación o muerte de las células microbianas durante el tiempo transcurrido entre el consumo y el análisis del alimento contaminado. Para una evaluación más exacta de la dosis infecciosa se necesita más información epidemiológica.

El conocimiento de la patogenia de *L. monocytogenes* ha sido posible dada la capacidad del microorganismo para infectar animales de laboratorio y células de mamífero en cultivos tisulares, crecer bien en los medios de laboratorio y gracias a su manipulación genética. Durante la última década haya habido importantes progresos en el estudio e identificación de los factores de virulencia de este patógeno intracelular, sumamente invasor (Cossart y Mengaud, 1989; Portnoy y col., 1992; Tilney y Tilney, 1993; Cossart y Kocks, 1994; Sheehan y col., 1994; Cossart, 1995; Dramsi y col., 1996).

2.7. CONTROL

El control de *Listeria* spp. depende de cuatro factores clave:

- Prevenir la contaminación de materias primas o el crecimiento en las materias primas, si estuviera presente el patógeno.
- Destruir o reducir el nivel del patógeno en las materias primas, si estuviera presente.
- Prevenir la recontaminación del ambiente de la fábrica, equipos o personal después de aplicar un tratamiento de reducción o destrucción.
- Minimizar su crecimiento durante la vida comercial del producto final.

Debido a la naturaleza ubicua de *L. monocytogenes*, el microorganismo puede representar un “mayor peligro” en aquellos alimentos que no están sujetos a un proceso posterior que reduzca o elimine el organismo. Tales productos incluyen los quesos fabricados con leche cruda, el pescado frío ahumado, los productos cárnicos fermentados y las ensaladas preparadas donde la materia prima sólo se somete a un tratamiento de lavado; el brote que tuvo lugar en Canadá en 1981 por consumo de ensalada de col evidencia este último aspecto (Schlech y col., 1983). Bell y Kyriakides (2000) clasifican las ensaladas de IV gama en una categoría de riesgo 3: riesgo medio, definiendo los productos de riesgo medio como «productos en los que *L. monocytogenes* puede estar presente debido a la contaminación de la materia prima o como una contaminación post-procesado y en los que normalmente el microorganismo no puede crecer o no estaría presente en grandes cantidades debido a la restricción del tiempo de conservación, las condiciones del producto o el tratamiento culinario listericida por parte del consumidor».

En el subcapítulo 3.4. *Seguridad de las ensaladas de IV gama “de la huerta a la mesa”*, se abordará más exhaustivamente el control de *L. monocytogenes* en estos productos, dentro de un marco de seguridad global.

CAPÍTULO 3. ENSALADAS DE IV GAMA EN ESPAÑA

3.1. INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES

El consumo de las ensaladas de IV gama ha experimentado un importante aumento en los últimos tiempos, debido principalmente a razones de índole social y nutricional. El papel nutricional de las ensaladas y las verduras en general, como fuentes fundamentalmente de fibra, vitaminas y minerales, es ampliamente reconocido por la sociedad. A esto hay que sumar la importancia que tiene su inclusión en la dieta como componente hipocalórico; la obesidad junto con el sedentarismo, se han convertido en hábitos de vida en los países industrializados, causando graves problemas para la salud, entre ellos la enfermedad cardiovascular, la diabetes y algunos tipos de cáncer. A este respecto, Europa, a través del programa de Salud Pública 2003-2008, llama la atención sobre la necesidad de elaborar planes y procesos que articulen una respuesta integrada a estos problemas de salud pública. La Consejería de Salud de la Junta de Andalucía ha puesto en marcha el Plan para la promoción de la actividad física y la alimentación equilibrada 2004-2008. Este interés por una nutrición equilibrada está reñido en muchas ocasiones con el tiempo que se dispone para cocinar, que va en descenso debido al modelo familiar de cónyuges trabajadores que prevalece hoy en día. Por tanto, las ensaladas de IV gama, que tan sólo necesitan aderezarse previo al consumo, constituyen una alternativa a la preparación tradicional de las ensaladas, que requiere cierto tiempo para lavar, trocear, cortar, pelar, rallar, etc. los ingredientes. Este hecho se refleja en los hábitos alimentarios; algunos estudios cualitativos han detectado un descenso del consumo de frutas y verduras en la última década, compensado en parte por un aumento del consumo de verduras y hortalizas procesadas y/o transformadas (Aranceta y col., 2003).

Según el Diccionario de la Lengua Española, la *ensalada* es la «hortaliza o conjunto de hortalizas mezcladas, cortadas en trozos y aderezadas con sal, aceite, vinagre y otras cosas». Sin embargo, actualmente, la ensalada puede llevar también otros ingredientes de toda índole: carnes, pescados, verduras, queso, frutas, frutos secos, cereales (maíz dulce, arroz), pasta, legumbres, etc. También se puntualiza que, aunque los vegetales suelen estar crudos, también pueden estar asados, cocidos, o fritos. En todos los casos, las ensaladas son platos fríos. La presente tesis se centra en el estudio de las ensaladas de IV gama a base de lechuga. La lechuga es la hortaliza para ensalada más popular

y es de gran importancia comercial, ocupando la mayor área de hortalizas para ensalada en el mundo (Ryder, 1981).

Se entiende por IV Gama las frutas y hortalizas frescas, limpias, troceadas y envasadas para su consumo, normalmente en bolsas, tarrinas o bandejas, y que suelen tener una fecha de caducidad en torno a los 7 días. El producto mantiene sus propiedades naturales y frescas, con la diferencia de que ya viene lavado, troceado y envasado, y no incorpora ningún tipo de conservante (FEPEX, Federación Española de Asociaciones de Productores y Exportadores y Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas). Wiley (1994a) definió las frutas y hortalizas mínimamente procesadas como «aquellas preparadas siguiendo uno o varias operaciones apropiadas, tales como el pelado, loncheado, troceado, etc. dado un tratamiento de conservación parcial pero que puede incluir el uso moderado de calor, conservantes o irradiación. La conservación o tecnología de obstáculos puede incluir control de pH, antioxidantes, agua clorada, o una combinación de estos u otros tratamientos. Normalmente, a estos tratamientos de preparación y conservación, le sigue un envasado en atmósfera modificada o al vacío, y un almacenamiento posterior a temperaturas de refrigeración durante el almacenamiento, distribución, y almacenamiento final por los consumidores hasta el momento de preparación para su consumo».

En España, la IV Gama fue introducida hacia los años 80 en Navarra, y ha ido adquiriendo cada vez más importancia, extendiéndose a otras zonas típicas de producción hortofrutícola como Murcia, Comunidad Valenciana, Andalucía y Cataluña. El consumo también ha crecido considerablemente en los hogares españoles y sobre todo en los restaurantes y el sector de la hostelería y comida rápida. El sector de IV Gama en España alcanza un volumen de negocio aproximado de 180 millones de euros.

3.2. CLASIFICACIÓN LEGISLATIVA Y CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

La legislación española de aplicación en este tipo de productos es el Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, *por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas*, que define comida preparada como la «elaboración culinaria resultado de la preparación en crudo o del cocinado o del precocinado, de uno o varios productos alimenticios de origen animal o vegetal, con o sin la adición de otras sustancias autorizadas y, en su caso, condimentada. Podrá presentarse envasada o no y dispuesta para su consumo, bien directamente, o bien tras un calentamiento o tratamiento culinario adicional». Además, define también comida preparada con tratamiento térmico como «aquella comida preparada que durante su elaboración ha sido sometida en su conjunto a un proceso térmico (aumento de temperatura), tal que pueda ser consumida directamente o con un ligero calentamiento».

El Real Decreto 3484/2000 clasifica las comidas preparadas en los siguientes grupos:

Grupo A: comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.

Grupo B: comidas preparadas con tratamiento térmico.

Grupo C: comidas preparadas sometidas a esterilización.

Grupo D: comidas preparadas envasadas, a base de vegetales crudos.

Las ensaladas de IV gama que se estudian en la presente tesis pertenecen al grupo D, comidas preparadas envasadas a base de vegetales crudos.

En la Unión Europea, se introdujo recientemente el Reglamento (CE) N° 2073/2005. En su Artículo 2 *Definiciones*, define los alimentos listos para el consumo como «aquellos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos». Esta definición se podría considerar un caso específico de las comidas preparadas (Real Decreto 3484/2000), pues las comidas preparadas contemplan también aquellas que pueden sufrir un tratamiento culinario, tal como el calentamiento, previo al consumo, no así los alimentos listos para consumo.

El R.D. 3484/2000 establece que la acción que se debe emprender cuando se superen los límites establecidos para los gérmenes patógenos, es retirar del mercado los productos afectados y excluirlos del consumo humano. El

Reglamento (CE) N° 2073/2005 proporciona una información más completa de los criterios microbiológicos, pues contempla además el método analítico que se debe utilizar. El Codex Alimentarius (1997) hace referencia a los componentes que debe contemplar un criterio microbiológico; en este sentido, el Reglamento (CE) N° 2073/2005 sigue las recomendaciones del Codex. Como se puede observar, el plan de muestreo de *L. monocytogenes* dado por ambos documentos varía, así como los límites microbiológicos para *E. coli*.

A continuación se presenta un cuadro comparativo de los criterios microbiológicos establecidos por el R.D. 3484/2000 para el grupo D, y por el Reglamento (CE) N° 2073/2005, aplicables a las ensaladas de IV gama:

Tabla 3.1. Criterios microbiológicos aplicables para las ensaladas de IV gama por el R.D. 3484/2000 (grupo D) y el Reglamento (CE) N° 2073/2005.

R.D. 3484/2000 (grupo D)		Reglamento (CE) N° 2073/2005		
Plan de muestreo y límites	Fase en la que se aplica el criterio	Plan de muestreo y límites	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
Testigos de falta de higiene: <i>Escherichia coli</i> n=5, c=2, m=10, M=10 ²		Criterios de higiene de los procesos: <i>Escherichia coli</i> en frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo): n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³		
Patógenos: <i>Salmonella</i> n=5, c=0, Ausencia/25 g		Criterios de seguridad alimentaria: <i>Salmonella</i> en frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo): n=5, c=0, Ausencia/25 g		
Producto listo para su comercialización, venta o suministro		Productos comercializados durante su vida útil		
<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=2, m=10, M=10 ²		<i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales: ⁽²⁾ n=5, c=0, m=M=10 ²		
Producto listo para su comercialización, venta o suministro		Productos comercializados durante su vida útil		
		⁽³⁾ n=5, c=0, Ausencia/25 g		
		Antes de que el alimentos haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que los ha producido		

n= número de unidades de la muestra.

m= valor umbral del número de bacterias (ufc/g). El resultado se considerará satisfactorio si todas las unidades que componen la muestra tienen un número de bacterias igual o menor que m.

M= valor límite del número de bacterias (ufc/g). El resultado se considerará no satisfactorio si una o varias unidades que componen la muestra tienen un número de bacterias igual o mayor que M.

c= número de unidades de la muestra, cuyo número de bacterias podrá situarse entre m y M. La muestra seguirá considerándose aceptable si las demás unidades tienen un número de bacterias menor o igual a m.

⁽¹⁾En caso de resultados insatisfactorios, la acción correctora consistirá en mejorar la higiene de la producción y la selección de las materias primas.

⁽²⁾Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. El explotador podrá fijar límites intermedios durante el proceso que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

⁽³⁾Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.

3.3. ESTADO ACTUAL DE LAS ENSALADAS DE IV GAMA EN ESPAÑA

El Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación elabora unos informes que presentan datos muy interesantes acerca del el consumo alimentario a nivel nacional.

En el año 2004, la media del consumo de frutas y hortalizas transformadas fue de 13,5 kg/cápita, estando Cataluña de la cabeza del ranking de comunidades autónomas. Andalucía se sitúa como la novena comunidad en dicho ranking, como se puede ver en la siguiente Figura:

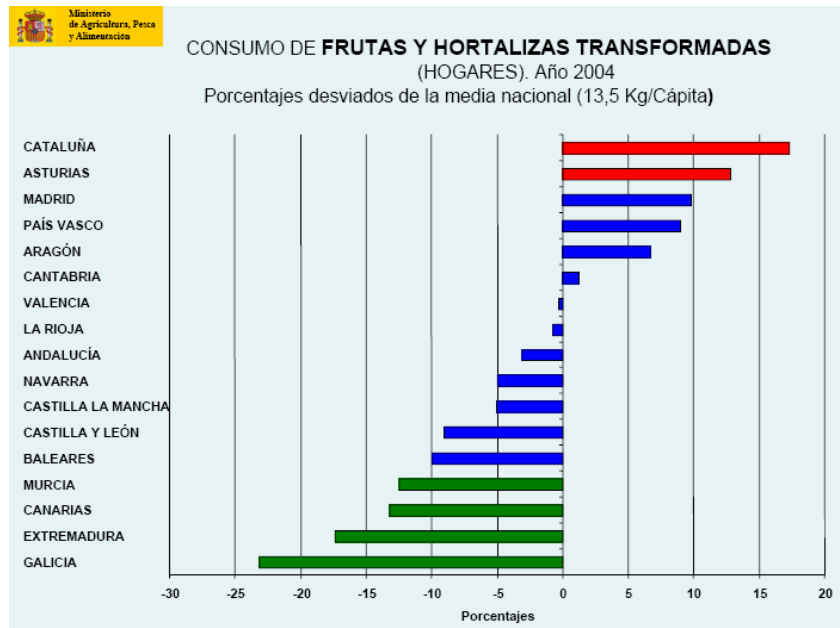


Figura 3.1. Consumo en los hogares de frutas y hortalizas transformadas en el año 2004. Porcentajes desviados de la media nacional (13,5 kg/cápita).

En la Tabla 3.2 se puede observar la evolución del consumo de frutas y hortalizas transformadas durante los años 2004 y 2005, así como el porcentaje de cambio a nivel nacional.

El consumo de frutas y verduras transformadas en el año 2005 se sitúa en 18,2 kg/cápita. Este aumento en el consumo cobra aún mayor importancia cuando se observa el orden que ocupa el grupo de frutas y hortalizas transformadas entre los productos alimenticios que han experimentado mayor crecimiento (Figura 3.2).

Tabla 3.2. Consumo (millones de Kg) de frutas y hortalizas transformadas durante los años 2004 y 2005, y porcentaje de cambio.

	Año 2004	Año 2005	% 05/04
Hogares	566,60	582,20	2,8
Extracomercio (hostelería/restauración e instituciones)	180,29	196,38	8,9
TOTAL	746,89	778,58	4,2



Fuente: Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria 2.005

Figura 3.2. Productos con mayor crecimiento en volumen durante el año 2005.

Estos cambios en los hábitos de consumo se pueden explicar por los cambios sociales que acontecen en la sociedad española. Estos cambios se pueden resumir en: más hogares con adultos > 50 años, más personas viviendo solas y más hogares sin niños. Un desglose de la evolución de la población se presenta en la Figura 3.3.

Los grupos sociales que han experimentado mayor crecimiento son los adultos independientes y las parejas de adultos sin hijos; los primeros se caracterizan por ser personas preocupadas por la salud y la dieta (sin abandonar el placer), ser hedonistas y comprar comida preparada; los segundos se caracterizan por ser tradicionales y planificados, sensibles a los precios bajos y preocupados por la salud.

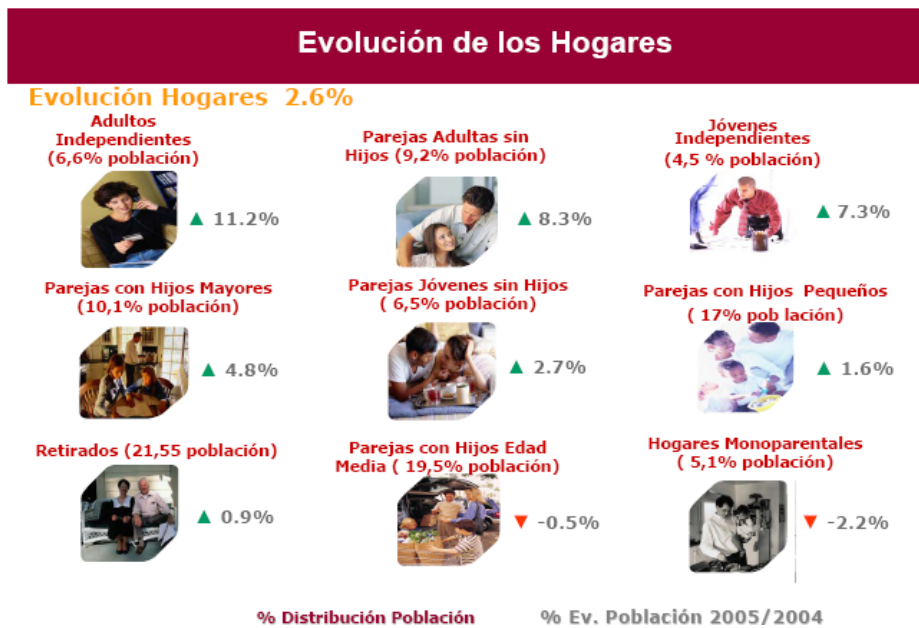


Figura 3.3. Evolución de los hogares en el año 2005 con respecto al 2004.

Los grupos sociales que han experimentado mayor crecimiento son los adultos independientes y las parejas de adultos sin hijos; los primeros se caracterizan por ser personas preocupadas por la salud y la dieta (sin abandonar el placer), ser hedonistas y comprar comida preparada; los segundos se caracterizan por ser tradicionales y planificados, sensibles a los precios bajos y preocupados por la salud.

En el año 2005, España cuenta con 42.566.275 personas y 15.066.810 hogares; estas cifras suponen un incremento con respecto al año 2004 del 6,8% y el 18,8%, respectivamente. En el 2005, el número medio de personas por hogar es de 2,78 personas. El gasto alimentario ha crecido en el 2005 un punto más que el crecimiento poblacional; esto indica que los hogares que más crecen en la población son los que más contribuyen al aumento del gasto.

En el año 2005, las razones por las que los consumidores seleccionan los alimentos son, en orden de importancia: saludable/sano (34,8%), rápido de preparar (33,4%), por costumbre (26,9%), todos los productos disponibles (21,6%), por placer/apetencia (18,5%), cómodo de preparar (16,8%), el favorito de la familia (12,9%), por apetecer un cambio (6,1%), necesidad de consumirlo/acabarlo (5,8%), tener hambre que llena (4,6%), otras razones

(4,2%), régimen/dieta (3,5%), ocasión especial/invitados (2%). Se puede concluir que la salud se sitúa en el primer lugar, acorde con los resultados obtenidos en los últimos años, seguido por la rapidez.

En España, las empresas españolas productoras de frutas y hortalizas de IV gama se asociaron en el año 2005 con el objetivo de responder a las necesidades de esta actividad productiva y económica, con un fuerte crecimiento y en pleno proceso de expansión. La asociación se denomina AFHORLA, Asociación Española de frutas y hortalizas lavadas listas para su empleo (IV Gama). Fue constituida por las mayores empresas españolas de este sector: Vega Mayor S.A, ubicada en Navarra, Verdifresh S.L. (Castellón), Sogesol (Murcia), Kernel Export (Murcia), Primaflor (Almería), Tallo Verde S.L. (Barcelona) y Actel SCCL (Lérida). AFHORLA se asoció a FEPEX (Federación Española de Asociaciones de Productores y Exportadores y Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas), con el fin de consolidarse como una categoría específica dentro de las frutas y hortalizas y mejorar la defensa de los intereses de sus asociados en el marco de una Federación con amplia presencia nacional e internacional. Los primeros temas

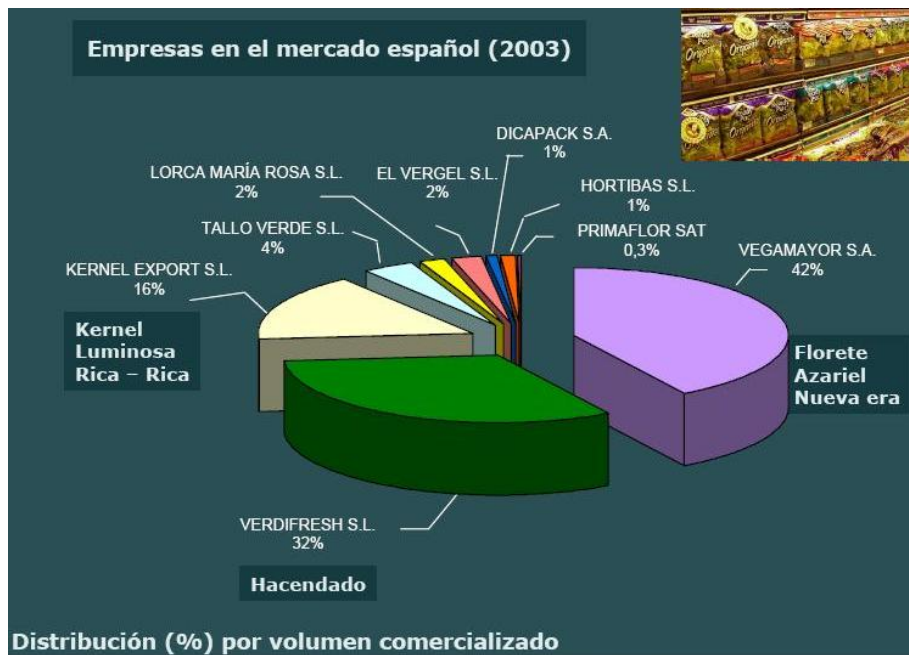


Figura 3.4. Distribución (%) por volumen comercializado de las empresas de frutas y hortalizas lavadas listas para su empleo. Fuente: Lobo y González (2006).

que han comenzado a estudiarse en AFHORLA son el establecimiento de un marco normativo, así como la elaboración de una guía de buenas prácticas agrícolas, entre otros aspectos. Las empresas que forman parte de AFHORLA tienen el 90% de la producción nacional.

Estas empresas contribuyen al mercado español en los porcentajes que se muestran en la Figura 3.4.

De las hortalizas de IV gama que se producen en España, la lechuga ocupa el primer lugar (60%), como se puede observar en la Figura 3.5:



Figura 3.5. Producción actual de hortalizas mínimamente procesadas. Fuente: Lobo y González (2006).

3.4. SEGURIDAD DE LAS ENSALADAS DE IV GAMA “DE LA HUERTA A LA MESA”

La ensalada de IV gama es un alimento listo para consumo que, debido a las condiciones en la que se cultiva, distribuye y procesa, no impide la contaminación por *L. monocytogenes* a través del aire, tierra, agua, insectos, animales y actividad humana. Aunque el lavado en la industria alimentaria es una de las pocas etapas en las que se reduce la carga de microorganismos alterantes y patógenos, no puede considerarse como un proceso letal que elimine completamente *L. monocytogenes*. De hecho, múltiples estudios han demostrado que *L. monocytogenes* puede persistir después del lavado en la industria (Nguyen-The y Carlin, 1994; Szabo y col., 2000). Por tanto, la presencia potencial de *L. monocytogenes* en la ensalada, unido al pH neutro del producto, su contenido en agua, almidón, vitaminas, minerales y algunos lípidos, el uso de atmósferas bajas en oxígeno, y la naturaleza psicrotrofa de *L. monocytogenes*, puede favorecer la supervivencia y crecimiento del patógeno en ensalada de IV gama. Pese a que no se han detectado brotes de listeriosis en España relacionados con el consumo de ensalada de IV gama (de hecho, la incidencia en España en el año 2004 es muy baja, i.e. 0,2 casos/100.000 habitantes), la presencia de *L. monocytogenes* en productos alimenticios y/o en las instalaciones industriales es motivo de preocupación, dadas las terribles consecuencias de la enfermedad.

Muy recientemente, la IFPA (International Fresh-cut Produce Association), la PMA (Produce Marketing Association), la UFFVA (United Fresh Fruit and Vegetable Association) y la WGA (Western Growers Association) han publicado una “guía para minimizar los peligros microbiológicos asociados a la lechuga y las verduras de hoja frescas o mínimamente procesadas” (Anon., 2006). Esta guía intenta suplementar, no reemplazar, componentes de programas de seguridad alimentaria ya establecidos, como son las Buenas Prácticas Agrícolas, BPH, APPCC, etc. En los 10 últimos años, la seguridad alimentaria se ha centrado en la huerta/campo de cultivo y en las operaciones industriales, elaborando sofisticados programas de BPH y APPCC; a medida que se comprenden mejor todos los aspectos relacionados con la seguridad alimentaria de frutas y verduras, se va haciendo necesaria una nueva generación de guías que abarque la cadena completa “de la huerta a la mesa”.

Existen otros documentos disponibles que complementan lo recogido en la guía anterior, como son el documento “Field Cored Lettuce. Best

Practices”, elaborado por la NFPA (National Food Processors Association), IFPA (Internacional Fresh-cut Produce Association) y United Fresh Fruit & Vegetable Association (2001), y dos guías para minimizar los peligros microbiológicos para la seguridad alimentaria en frutas y verduras frescas (CFSAN, 1998) y en frutas y verduras de IV gama (CFSAN, 2006), elaboradas por el Centro para la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Aplicada en Estados Unidos (CFSAN, Center for Food Safety and Applied Nutrition).

Según la citada “guía para minimizar los peligros microbiológicos asociados a la lechuga y las verduras de hoja frescas o mínimamente procesadas”, cualquiera que sea el procesamiento aplicado al producto, todo programa de seguridad alimentaria implantado en este sector debe basarse en 4 principios básicos:

- Una vez que la lechuga/verduras de hoja se contaminan, es muy difícil eliminar completamente o matar los patógenos. Por tanto, la prevención de la contaminación en todas las etapas de la cadena “de la huerta a la mesa” es una práctica primordial, que se antepone a cualquier tratamiento de eliminación.
- La industria de la lechuga/verduras de hoja apoya la implantación de programas de seguridad alimentaria basados en resultados de evaluaciones de riesgo, que identifican riesgos significativos y hacen uso de medidas preventivas para asegurar productos inocuos.
- La industria de la lechuga/verduras de hoja también apoya la ejecución de programas de educación rutinarios para todas las personas relacionadas con la producción de este tipo de alimentos en cualquier etapa de la cadena “de la huerta a la mesa”.
- Muchos de los patógenos asociados con este tipo de productos son de origen humano, transmitidos vía fecal-oral. Por consiguiente, los programas de seguridad alimentaria implantados en la industria de la lechuga/verduras de hoja debe prestar especial atención al control, reducción y eliminación de una contaminación fecal potencial por personas y animales domésticos o salvajes, a través de las vías más probables, que son manos, agua y suelo.

La cadena “de la huerta a la mesa” de la lechuga/verduras de hoja sigue el esquema que se presenta en la Figura 3.6. Esta secuencia de pasos se puede resumir, desde el punto de vista de seguridad alimentaria, en 5 bloques diferenciados (Figura 3.7) que serán tratados a continuación. En cada blo-

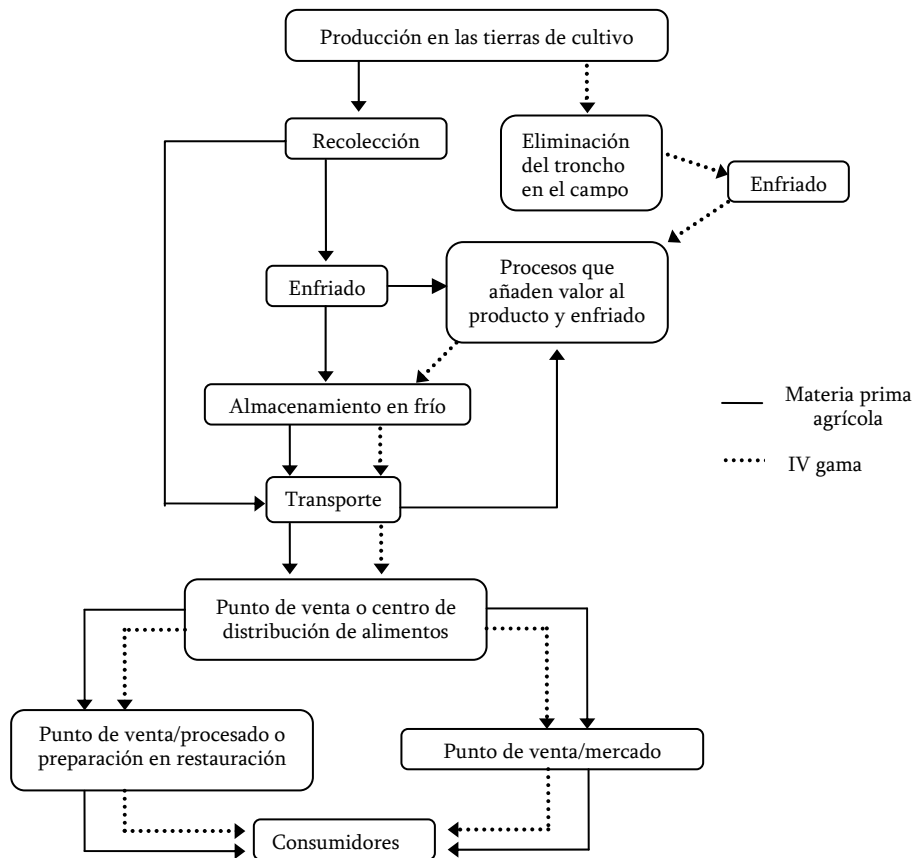


Figura 3.6. Cadena general “de la huerta a la mesa” para la lechuga y verdura de hoja.

que se citarán los aspectos que se han de tener en cuenta para preservar la seguridad de la lechuga/verduras de hoja.

3.4.1. OPERACIONES DE PRODUCCIÓN Y COSECHA

Los vegetales pueden contaminarse por *L. monocytogenes* a través del **agua** y la **tierra** (Wachtel y col., 2002b; Solomon y col., 2003), y más concretamente, a través del abono de las tierras de cultivo con **estiércol** (Gagliardi y Karns, 2000). El brote de listeriosis que hubo en Canadá en 1981 por consumo de ensalada de col se debió al uso, en las tierras de cultivo, de estiércol de oveja fresco y compost procedentes de animales con listeriosis reciente. Además, muchas materias primas vegetales se almacenaban durante

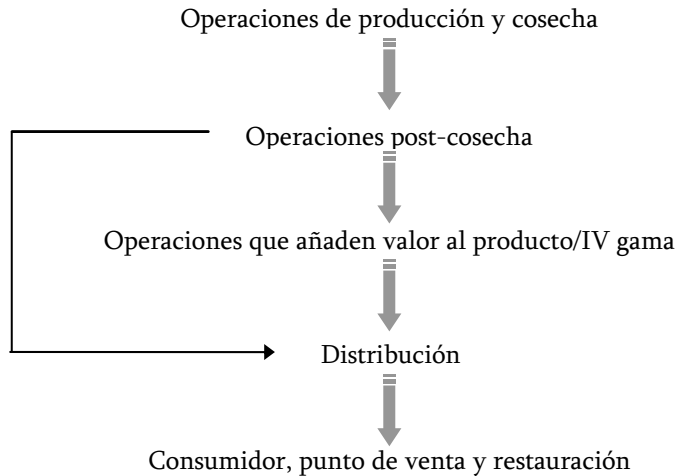


Figura 3.7. Operaciones sobre la lechuga/verduras de hoja.

largos períodos en frío para facilitar una provisión continua durante los meses de invierno. Como se puede deducir, el uso de estiércol en tierras de cultivo debe someterse a un proceso de compostaje apropiado que asegure que se genera el calor suficiente para reducir su contaminación microbiana antes del abono de las tierras. Siempre y cuando sea posible, se recomiendan fertilizantes artificiales.

Los **aperos de labranza** y las **máquinas cosechadoras** también pueden ser fuente de contaminación, por lo que se ha de establecer procedimientos de lavado y desinfección adecuados durante y después de las operaciones mecánicas. La **localización de la producción** tiene gran importancia para la seguridad del producto en dos vertientes: las **condiciones climáticas** y medioambientales, y la **invasión por animales**. Respecto a las condiciones climáticas, las regiones húmedas y frías favorecen la persistencia de patógenos (Takeuchi y col., 2000; Takeuchi y Frank, 2000), mientras que los climas secos, por requerir agua adicional, propicia una contaminación potencial por patógenos. En relación a los animales, teniendo en cuenta que las zonas de producción están en áreas rurales, de debe evitar la entrada de animales domésticos o salvajes en las áreas de producción (utilizar repelentes para animales, reducir estanques de agua, construir obstáculos físicos tales como bloques, etc.).

3.4.2. OPERACIONES POST-COSECHA

Las **lechugas y hortalizas de hoja se enfrían de forma rutinaria** tras su cosecha bien mediante enfriamiento por aire forzado, enfriamiento a vacío (lechuga iceberg), pulverización a vacío (hydrovac), enfriado (lechuga de hoja, verduras de hoja, lechuga romana, espinacas). Los aspectos higiénicos a tener en cuenta son: que el agua usada en hydrovac esté libre de patógenos, y evitar en lo posible que haya recirculación de agua; en caso de recirculación, asegurar que se mantiene un nivel de desinfectante suficiente para evitar el riesgo potencial de contaminación cruzada; diseñar procedimientos de limpieza y desinfección adecuados para los equipos empleados y, especialmente, las superficies de contacto; evaluar el drenaje asociado con el equipo de enfriamiento.

El **agua** usada en las operaciones post-cosecha debe ser de una calidad microbiológica apropiada. También se incluye aquí el hielo que entra en contacto directo con la lechuga/verduras de hoja o el agua usada como lubricante para facilitar el empaquetado de lechuga de hoja o romana, entera. Se debe analizar el agua periódicamente e incluir en programas sanitarios los tanques que almacenan el agua usada en operaciones de empaquetado.

Los **contenedores** o cargas usados en las tierras agrícolas deben almacenarse y limpiarse adecuadamente para evitar la contaminación cruzada en posteriores usos; las bolsas de 1 sólo uso deben emplearse con contenedores que no se pueden limpiar; en caso de usar contenedores de un sólo uso como son las cajas o los palés, se deben someter a procedimientos de almacenamiento y manipulación.

Las lechugas se pueden disponer en **contenedores en atmósfera modificada** (p. ej., con concentración de oxígeno reducida) para su envío a la planta de procesado. El empleo de atmósferas modificadas perserva la calidad organoléptica e impide el crecimiento de la flora alterante, pero esto último podría causar un efecto no deseado al permitir el crecimiento de patógenos como *Listeria* spp. Por tanto, es esencial que los procesos tecnológicos empleados para mejorar la calidad sean estudiados con especial atención para evitar solventar un problema de alteración a costa de la seguridad. Los equipos que se emplean para la aplicación de atmósferas modificadas deben someterse a procedimientos de limpieza y desinfección.

Los **vehículos de transporte** de la lechuga/hortaliza de hoja hasta las instalaciones de almacenamiento en frío deben estar en condiciones apropiadas de higiene; se deben implantar programas de inspección y gestión

de contenedores y tráiler para verificar que se observan las prácticas de higiene.

Aunque normalmente, las lechugas/verduras de hoja no se manipulan en las instalaciones de almacenamiento en frío, es posible que las personas que trabajen en dichas instalaciones puedan contaminar el producto con microorganismos de importancia para la salud pública, por lo que es preciso observar la **higiene del operario** siempre que se encuentre en las proximidades del producto. Por ello, se deben llevar a cabo las mismas prácticas que en el apartado anterior (Operaciones de producción y cosecha), en relación a la higiene de los operarios.

3.4.3. OPERACIONES QUE AÑADEN VALOR AL PRODUCTO/IV GAMA

La lechuga de IV gama sigue uno o más procesos de lavado antes de ser envasada y vendida. Los desinfectantes de **agua** pueden ser muy efectivos reduciendo la carga de microorganismos del producto y del agua de lavado. Diversos estudios científicos han demostrado que el lavado con agua clorada en frío produce una reducción de la población microbiana entre el 90-99%. Para el caso de *L. monocytogenes*, el lavado con agua clorada a niveles de cloro entre 50 y 200 ppm, produce, aproximadamente, una reducción de 1 logaritmo en el nivel del patógeno (Bell, 2002). La reducción microbiana en el producto es dependiente de la concentración de desinfectante, el tiempo de contacto y el ratio agua/producto (L/kg). En caso de existir patógenos en la superficie de la lechuga/verdura de hoja, no se pueden eliminar completamente mediante lavado; esto ocurre porque los microorganismos se adhieren a la superficie del producto, en lugares como los estomas, uniones celulares de la epidermis y ranuras a lo largo de las venas (Beattie y Lindow, 1999), donde los desinfectantes no pueden penetrar. Los microorganismos (patógenos y no patógenos) tienen una gran afinidad para adherirse a las superficies de corte (Bolin y Huxsoll, 1991).

El agua de lavado, en caso de estar contaminada, constituye un riesgo potencial para el producto. Se debe considerar lo siguiente: la calidad microbiológica del agua después del troceado de la hortaliza debe ser adecuada; si el agua de lavado después del troceado recircula, se ha de asegurar mediante monitorización una concentración de desinfectante adecuada para reducir el potencial de contaminación cruzada lechuga contaminada-agua-lechuga (en caso de utilización de desinfectantes con base de cloro, la forma con actividad antibacteriana y la que se ha de monitorizar es el ácido hipocloroso o cloro libre); es conveniente, en caso de reutilización

del agua, que el flujo de agua se dirija en sentido contrario al de avance del producto, de forma que a medida que el producto avanza, se expone a agua más limpia; evaluar algunos indicadores de calidad del agua tales como el pH, carga orgánica, turbidez, tierra, etc., para asegurar que el desinfectante es efectivo; a este respecto, se señala que la posible tierra o lodo adheridos a los vegetales ejercen un efecto negativo sobre la eficacia de los desinfectantes del agua (Pirovani y col., 2004); por último, se ha de evaluar el diseño del proceso para adecuar las operaciones al producto concreto que se trate (p. ej., evaluar la demanda de desinfectante del producto, evaluar el uso de sistemas de filtración para retirar la arena y la tierra del agua durante el procesado, evaluar cuándo se debe desechar o añadir agua).

La Guía para minimizar los peligros para la seguridad microbiológica de las frutas y vegetales de IV gama (CFSAN, 2006), aún en estado de borrador, propone lavar el producto antes y después de su cortado/troceado/pelado.

Las **nuevas tecnologías** que mejoran la calidad organoléptica o alargan la vida comercial deben estudiarse concienzudamente con el fin de asegurar la calidad sanitaria. En los últimos años se han realizado numerosos ensayos que evalúan factores físicos y químicos aplicados sobre las hortalizas mínimamente procesadas para mejorar la calidad organoléptica y/o microbiológica. De estos estudios, los aplicados a la lechuga mínimamente procesada incluyen factores como: cloro, ácido acético, ácido peracético, ácido peroxiacético, mezcla de ácido peroxiacético y peróxido de hidrógeno, hipoclorito sódico, dicloroisocianurato sódico, clorhidrato cálcico, cloruro cálcico, sorbato potásico, ácido cítrico, ácido ascórbico, extracto de ajo, calentamiento suave, dióxido de cloro, fosfato trisodio con cloro, agua ozonificada, agua electrolizada, radiación gamma (Beuchat y Brackett, 1990b; Zhang y Farber, 1996; Beuchat y col., 1998; Delaquis y col., 2000; Li y col., 2001; Park y col., 2001; Garcia y col., 2003; Roura y col., 2003; Nascimento y col., 2003; Ihl y col., 2003; Szabo y col., 2003; Burnett y col., 2004; Pirovani y col., 2004; Rodgers y col., 2004; Lang y col., 2004; Beuchat y col., 2004; Baur y col., 2005; Beltran y col., 2005; Zhang y col., 2006). En IV gama, el envasado de la lechuga/hortaliza de hoja en atmósfera modificada es una práctica muy común (Wiley, 1994b; Schlimme y Rooney, 1994; Solomos, 1994; Werner y Hotchkiss, 2006). En Estados Unidos, la Food and Drug Administration (Institute of Food Technologists, 2001) recomienda para la lechuga una concentración de oxígeno de 0,5-3% y de dióxido de carbono entre 5-10% (a excepción de la lechuga iceberg, para la que recomienda entre 10-15% dióxido de carbono) a una temperatura de almacenamiento de 0-5°C.

Esta atmósfera modificada, con una concentración de oxígeno muy reducida, inhibe los microorganismos aerobios, que usualmente “avisan” al consumidor de la alteración del producto; esta inhibición del crecimiento tiene un efecto secundario negativo, pues al no crecer, no compiten con otros microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos, cuyo crecimiento se vería favorecido: tal es el caso de *L. monocytogenes*. Así pues, el envasado en atmósfera modificada permite prolongar la vida comercial del producto, lo que supone un período de tiempo mayor para permitir el crecimiento de patógenos como *L. monocytogenes* (Berrang y col., 1989).

El **envasado** del producto se debe llevar a cabo en condiciones que no supongan una contaminación del mismo; asimismo, el proveedor del material de embalaje debe conocer su finalidad.

La Guía mencionada anteriormente también señala la conveniencia de implantar el denominado sistema FIFO (First In First Out; el primero en entrar es el primero en salir) en el procedimiento de utilización de materias primas, materiales de envasado y salida del producto terminado, así como el almacenamiento a 4°C de las materias primas y el producto terminado. También propone un plan para el lavado y desinfección, y de mantenimiento de los equipos y materiales.

El **etiquetado del producto** debe ser tal que no deje ninguna duda al consumidor de la no necesidad de lavarlo en casa; así, en los productos de IV gama se debe indicar en la etiqueta “lavado” o “triple lavado” o “listo para consumo”.

En cuanto a las **instalaciones industriales**, es posible que no haya un patógeno que se desarrolle mejor en las dependencias de una industria alimentaria que *L. monocytogenes*. La investigación de numerosos brotes indica que el ambiente es un factor que contribuye muy significativamente a la contaminación del producto. El organismo sobrevive bien en ambientes fríos, húmedos y puede proliferar allí donde la limpieza y la higiene han sido deficientes. La contaminación del producto por *Listeria* spp. puede ocurrir a través del ambiente por aerosoles o a través del contacto directo con superficies, tales como utensilios, equipamiento o manipulación del personal.

La infraestructura de la industria debe permitir que las materias primas y el producto terminado estén localizadas en áreas distintas, y que el personal no pueda pasar de un área a otra sin la aplicación de procedimientos que prevengan el paso de contaminación entre estas zonas, que se denominan comúnmente como “de bajo riesgo” y de “alto riesgo” o máxima precaución.

Estas áreas están físicamente divididas por paredes. El personal que entre en la zona de alto riesgo debe cambiarse de ropa previamente en una zona aislada destinada a este propósito, quitándose zapatos y vestimenta, y poniéndose ropa, calzado y gorro destinados al área de alto riesgo de la industria. Los alimentos deben progresar desde el área de bajo riesgo hacia el de alto riesgo. Además, para minimizar la entrada de patógenos bacterianos, se puede establecer una presión de aire positiva desde el área de alto riesgo hacia la de bajo riesgo. Todo esto debe estar descrito en el plan general de higiene “Buenas prácticas de fabricación”. La Asociación de alimentos frescos de Londres (Anon., 1997) proporciona una guía detallada de estos controles.

Una limpieza y desinfección del ambiente y de los equipos y utensilios son absolutamente esenciales para prevenir el acúmulo de microorganismos y su posible aparición en el producto. Todos los equipos, como las máquinas cortadoras, los tanques de mezcla, tuberías y cintas transportadoras deben desmontarse total o parcialmente de forma rutinaria para permitir una limpieza y desinfección adecuadas. También las superficies de contacto no obvias, como las mesas en su cara interna y lados, los pomos de las puertas o las tuberías elevadas deben someterse a procedimientos de limpieza y desinfección, pues podrían actuar como reservorios de *L. monocytogenes* y contaminar el alimento u otras superficies de contacto a través de aerosoles o las manos del personal (Grau, 1993). Flores y col. (2004) aislaron recientemente *L. monocytogenes* de paredes, suelo, sumideros, etc., de varias industrias de vegetales congelados.

Como procedimiento de verificación del Plan de limpieza y desinfección, se pueden realizar análisis microbiológicos de coliformes o tests de bioluminiscencia del ATP, que monitorizan la presencia de residuos de producto y microorganismos, aunque los tests específicos para *Listeria* spp. son los que proporcionan información específica sobre el organismo y su control en el ambiente de la fábrica (Bell y Kyriakides, 2000).

3.4.4. DISTRIBUCIÓN

Independientemente de las rutas de distribución que siga el producto, en todos los casos se debe tener en cuenta que los **vehículos de transporte** (contenedores y trailer) estén limpios; implantar procedimientos de inspección y evaluación de las condiciones sanitarias de los contenedores y trailer (limpieza de las paredes y suelo, buenas condiciones estructurales, es decir, exento de agujeros o daños que deteriore el material aislante, ausencia de olores extraños, correcto funcionamiento del circuito de aire frío); acordar

contractualmente con las compañías de transportes los requisitos higiénicos que han de reunir los medios de transporte, p. ej., establecer restricciones en las cargas previas para evitar la posibilidad de contaminación cruzada.

Las **instalaciones de enfriamiento** donde se mantiene el producto durante la distribución deben estar en condiciones higiénicas; se deben seguir Buenas Prácticas de Manipulación, control de plagas, formación de los operarios, etc.

El control de **temperatura** es fundamental para productos perecederos como la lechuga/hortalizas de hoja, pues sólo las temperaturas de refrigeración aseguran una vida comercial óptima y la calidad del producto.

3.4.5. CONSUMIDOR, PUNTO DE VENTA Y RESTAURACIÓN

El Código de Alimentos de la U.S. Food and Drug Administration (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/foodcode.html>) establece procedimientos específicos para el almacenamiento, presentación de los alimentos, exclusión o restricción de operarios enfermos, lavado de manos, marcado de fechas y para la limpieza y desinfección de los equipos. En España, el Real Decreto 3484/2000 expone las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas, y el Real Decreto 202/2000, de 11 de febrero, regula las normas relativas a los manipuladores de alimentos.

Las consideraciones más importantes que se han tener en cuenta en esta fase son: la restricción o exclusión de trabajadores enfermos, manipulación higiénica de los manipuladores, calidad del agua y contaminación cruzada.

En los puntos de venta al por menor y en las empresas de restauración, la lechuga/verduras de hoja de IV gama deben almacenarse y presentarse en refrigeración; además, los manipuladores deben lavarse las manos con jabón y agua siempre antes de manipular el producto, y en general, tantas veces como sea necesario; el agua debe ser de una calidad microbiológica adecuada. Se pueden usar guantes o utensilios apropiados que actúen como barrera para manipular la lechuga/verdura de hoja de IV gama, pero se han de cambiar con suficiente frecuencia para prevenir la contaminación cruzada; esta práctica no exime al manipulador de lavarse las manos. La lechuga/hortaliza de hoja fresca (no mínimamente procesada) no requiere refrigeración para efectos de seguridad alimentaria. La **preparación** en las empresas de restauración o en puntos de venta, se deben seguir unas pautas higiénicas adicionales a las mencionadas anteriormente, y son: retirar las partes deterioradas del producto, pues podrían albergar patógenos (Wells y Butterfield, 1997), e incluso desechar la unidad completamente si el deterioro es muy severo; lavar

el producto; cortar, y volver a lavar en un contenedor o barreño limpio (sumergir y agitar el producto troceado y tirar el agua; repetir tantas veces como sea necesario); limpiar y desinfectar los equipos y utensilios que contacten con el producto (tablas de corte, cuchillos, etc.) lavando con agua caliente y jabón, seguido de aclarado, desinfectar, aclarar y dejar secar al aire. Se debe prevenir en todo caso la contaminación cruzada, p. ej., separando los utensilios y superficies empleados para la preparación de la hortaliza, de los empleados para preparar carne cruda, pollo, etc.

En caso de que la lechuga/hortaliza de hoja se prepare como IV gama en puntos de venta o en la industria alimentaria, se debe establecer una política de **vida comercial** e indicar en la etiqueta del producto “preparar antes del día ___/___” o “usar preferentemente antes de”. Dado que en las ensaladas de IV gama no se suelen emplear ingredientes inhibidores como la sal o ácidos, el único medio práctico para asegurar la limitación del crecimiento es restringir la vida comercial. Se puede estimar la vida comercial del producto usando modelos predictivos para el crecimiento de *L. monocytogenes*, aconsejándose su validación en el alimento en cuestión. Recientemente, Ransom (2005) consideró que la vida comercial de alimentos refrigerados debería basarse en el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Además de fecha de caducidad, en el etiquetado deben aparecer las indicaciones “guardar en refrigeración”, “listo para consumo” y “lavado” o “triple lavado”. Puesto que la **temperatura** es el factor crítico para la seguridad de las ensaladas de IV gama en relación con *L. monocytogenes*, estas indicaciones en la etiqueta son de vital importancia. Por otra parte, algunos sectores de la población son más vulnerables a la infección por *L. monocytogenes* que otros, por lo que es una práctica común aconsejar a estos sectores que eviten el consumo de ciertos alimentos. Esto se puede llevar a cabo mediante trípticos con consejos para el consumidor o a través otros medios de comunicación en campañas de concienciación general.

Es posible que, si se desea **recuperar la textura crujiente** de la lechuga/verdura de hoja de IV gama, se introduzca el producto en recipientes con agua potable; el agua debe ser de calidad microbiológica adecuada, el recipiente o fregadero debe lavarse y desinfectarse previamente antes de su uso; el agua debe renovarse con suficiente frecuencia para asegurar el mantenimiento de la calidad microbiológica, e incluso optar por disponer el producto bajo el agua cayendo directamente del grifo, en lugar de sumergirlo en agua, y así disminuir el potencial de contaminación cruzada.

La posibilidad de que el **consumidor** contamine el producto fresco por **contaminación cruzada** no es en absoluto despreciable. Li-Cohen y Bruhn (2002) llevaron a cabo una encuesta en Estados Unidos enviando un cuestionario por correo a 2000 hogares seleccionados al azar; el 6% de los consumidores respondió que nunca o casi nunca lavan el producto fresco antes de consumirlo. Un 23% indicó que colocan la carne y pescado sobre otros alimentos en las baldas del frigorífico. Estas observaciones indican la necesidad de un plan de educación para enfatizar las prácticas de manipulación higiénicas desde la compra hasta el consumo. Por ejemplo, en Estados Unidos, la Alianza para la Educación sobre la Seguridad de los Alimentos (Partnership for Food Safety Education; <http://www.fightbac.org/>) tiene como objetivo la educación del público en seguridad alimentaria.

3.5. EVALUACIÓN Y GESTIÓN DEL RIESGO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ENSALADAS DE IV GAMA

Por todo lo expuesto en los capítulos anteriores, se concluye que *L. monocytogenes* es un patógeno que puede contaminar potencialmente los vegetales, que el procesado en la industria no garantiza la total eliminación del patógeno en caso de estar presente en el alimento, y que su naturaleza psicotrofa hace posible el crecimiento del microorganismo hasta alcanzar niveles peligrosos para el consumidor.

Si bien es cierto que no se han detectado brotes de listeriosis en España relacionados con el consumo de ensalada de IV gama (de hecho, la incidencia en España en el año 2004 fue muy baja, 0,2 casos/100.000 habitantes), la presencia de *L. monocytogenes* en productos alimenticios y/o en las instalaciones industriales origina una gran preocupación entre industriales y Autoridades Sanitarias, dadas las terribles consecuencias de la enfermedad.

La implantación de los sistemas de autocontrol en las industrias alimentarias persigue la producción de alimentos seguros. Sin embargo, los distintos estudios de prevalencia de *L. monocytogenes* en ensaladas de IV gama ponen de relevancia que la seguridad total (ausencia de patógenos) no es posible. La autoridad sanitaria debe cuantificar en qué se traduce dicha “falta de seguridad” (ER) y cuáles son los factores que influyen sobre la presencia del microorganismo en el producto. A este respecto, el Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, *sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos* establece que la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) es la Autoridad responsable de evaluar los riesgos alimentarios (ER). El resultado de una ER no es sino el número de casos de infección, enfermedad o muerte, según el modelo dosis-respuesta empleado en la ER. En la mayoría de los casos, dada la incertidumbre de los modelos dosis-respuesta y otras variables, además del hecho de que son muchos los casos no notificados, el resultado cuantitativo de una ER carece de valor en sí mismo, no coincidiendo generalmente con el número de casos observados en la población objeto de estudio. Sin embargo, su valor relativo es sumamente importante para comparar los resultados de ER llevadas a cabo en distintos países, y para proponer medidas de Gestión del Riesgo encaminadas a reducir el número de casos en una población.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Análisis del Riesgo microbiológico de *Listeria monocytogenes* a través del consumo de ensaladas de IV gama en España, mediante la Evaluación cuantitativa del riesgo y la propuesta de medidas para la Gestión del Riesgo.

Objetivos específicos:

1. Estudio de la repercusión de los criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* (Reglamento (CE) N° 2073/2005) aplicables en las industrias productoras de ensaladas de IV gama.

2. Obtención de datos necesarios para el Análisis del Riesgo: hábitos de consumo de ensaladas de IV gama y temperatura de frigoríficos domésticos, así como también el estudio del crecimiento de *L. monocytogenes* en ensalada de IV gama a diferentes temperaturas.

3. Evaluación cuantitativa y estocástica del riesgo de listeriosis por consumo de ensaladas de IV gama en la población española.

4. Aproximación a la Gestión del riesgo de listeriosis por consumo de ensaladas de IV gama en la población española mediante la aplicación de diferentes medidas de gestión.

IV. PUBLICACIONES

CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS EN ALIMENTOS DE IV GAMA SEGÚN LA NORMATIVA VIGENTE

RESUMEN

El presente estudio tuvo su origen en el surgimiento de una nueva normativa comunitaria, el Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, que establece los criterios microbiológicos en alimentos. El cumplimiento de los criterios microbiológicos ofrece la seguridad (con un determinado nivel de confianza) de que patógenos potenciales no estén presentes a concentraciones inaceptables en el alimento, aunque no garantiza su ausencia (EFSA, 2007). Así pues, el cumplimiento de los criterios tiene un impacto positivo sobre el riesgo microbiológico, pues los lotes defectuosos son rechazados con alta probabilidad, y los lotes conformes son aceptados, también con alta probabilidad. Este aspecto se desarrolló en el apartado 1.2.2.8. *Establecimiento de criterios microbiológicos para el producto final.*

La disyuntiva creada por el citado Reglamento para el patógeno *Listeria monocytogenes* en la categoría de *alimentos listos para consumo que pueden favorecer el desarrollo de L. monocytogenes, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales*, nos movió a plantear el presente trabajo. El Reglamento establece dos criterios microbiológicos para dicha categoría: (i) el nivel de *L. monocytogenes* debe ser < 100 ufc/g durante la vida útil del producto, (ii) ausencia en 25 g de producto antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido. La aplicación del primer criterio depende de la demostración por parte del industrial de que no se excederá un nivel de 100 ufc/g de *L. monocytogenes* durante su vida comercial; en caso contrario, el criterio de elección sería el segundo. Esta demostración debe basarse en características físico-químicas del producto y en la consulta de literatura científica y, si es necesario, en modelos cuantitativos y/o experimentos de inoculación del patógeno en el producto. En caso de constatarse el crecimiento potencial del patógeno en un alimento específico, bien por las características físico-químicas del alimento, o bien mediante consulta de literatura científica, se considera adecuado emplear modelos cuantitativos y/o llevar a cabo experimentos de inoculación del patógeno, con el objetivo de estudiar la capacidad de *L. monocytogenes* para crecer en el alimento en cuestión. El interés por esta demostración radica en que el primer criterio es

más permisivo que el segundo, pudiendo estar el patógeno presente en el alimento.

En este trabajo se realizó dicha demostración con endivias de IV gama. Se aplicó un modelo predictivo secundario (Pin y col., 2001) y el modelo predictivo primario de Baranyi y Roberts (1994) ajustado a datos de crecimiento de *L. monocytogenes* en endivias de IV gama envasadas con atmósfera de CO₂ (Carlin y col., 1996b). Con ambos, se calcularon tasas máximas específicas de crecimiento: en el caso del modelo secundario, se investigaron concentraciones de CO₂ de 0, 10, 20, ..., 80% a las temperaturas de los frigoríficos domésticos halladas por Azevedo y col. (2005); en el caso del modelo primario, dados los datos disponibles, se investigaron sólo el 10, 30 y 50% de CO₂ a 10°C. Con estas tasas, se calculó mediante la ecuación de crecimiento exponencial, el nivel final de patógeno en endivias a partir de un nivel inicial de 10 ufc/g. En esta ecuación, el tiempo de vida comercial considerado fue 1, 2, 3, ..., 14 días. Los resultados que se derivaron de la aplicación del modelo secundario fueron muy conservadores (nivel final superó los 100 ufc/g), de forma que la utilización de este modelo por un fabricante para llevar a cabo la demostración anteriormente expuesta, daría lugar a la obligación de cumplir con el criterio de ausencia en 25 g. Sin embargo, la aplicación del modelo primario permitió en algunas condiciones (9 de 42) la no superación del límite 100 ufc/g al final de la vida comercial. Por tanto, son estas condiciones de CO₂ y vida comercial las que el fabricante debería emplear si desea acogerse al criterio 100 ufc/g.

La siguiente publicación recoge el trabajo presentado:

Quantitative models application to fulfil microbiological criteria in foods

E. Carrasco¹, A. Valero¹, F. Pérez¹, E. Todd², R. García-Gimeno¹, and G. Zurera¹

¹Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Edificio Darwin – Anexo, 14014 Córdoba, Spain.

²National Food Safety & Toxicology Center, 165 Food Safety & Toxicology Building, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1314, USA.

Modern multidisciplinary applied microbiology. Exploiting microbes and their interactions (pp. 328-332). 1st edition. Méndez-Vilas (ed.). Wiley-VCH, Weinheim (Germany). July 2006.

QUANTITATIVE MODELS APPLICATION TO FULFIL MICROBIOLOGICAL CRITERIA IN FOODS

ABSTRACT

A recent ¹Draft Regulation adopted by the Commission of the European Communities establishes microbiological criteria in foods. For the pathogen *Listeria monocytogenes* in a specific food category, two different microbiological criteria are proposed, and the application of either depends on the demonstration that *L. monocytogenes* will not exceed a certain level in the product throughout its shelf-life. This demonstration should be based on predictive microbiology and quantitative models. Two types of quantitative modes were applied. From 10 cfu/g starting level of the microorganism, only 9 out of 42 conditions led to levels below the target value established by the Draft Regulation. These conditions were different combinations of values of the factors CO₂ and shelf-life. This work is intended to illustrate that it is not compulsory to fulfil the microbiological criterion *absence in 25 g* as long as manufacturers establish proper values of these factors so that the target value is not exceeded.

Keywords: food safety; *Listeria monocytogenes*; microbiological criteria; quantitative models.

¹En la fecha en la que se realizó este trabajo, el Reglamento estaba aún en estado de borrador. Por ello, aparece el término “Draft” en la publicación que se presenta a continuación.

1. INTRODUCTION

Research on food microbiology is continuously promoting revisions in regulations, such as microbiological criteria in foodstuff, which are intended to be incorporated in national legislation.

In 1997, Codex alimentarius [1] stated that "a microbiological criterion defines the acceptability of a product or a food lot, based on the absence or presence, or number of microorganisms including parasites, and/or quantity of their toxins/metabolites, per unit(s) of mass, volume, area or lot".

Listeria monocytogenes has been recognized as a pathogen in animals for more than 70 years [2], but only in the last 25 years it has been considered as a microorganism of concern especially for food industries, because of being a zoonotic agent which causes a food-borne listeriosis.

In 1999, the Scientific Committee on Food (SCF) and the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH), from the European Commission, were asked to give scientific advice on *L. monocytogenes* as a food-borne pathogen, as no microbiological criteria had been established with the exception of those just mentioned in the Council Directive 92/46/CE [3], and due to the substantial controversy existing in the intra-Community trade as result of the absence of agreed reference values. Finally, two documents were presented, by both SCF [4] and SCVPH [5]. Specifically, SCVPH discusses *L. monocytogenes* levels which could be relevant in a possible further effort to lower the incidence of food-borne listeriosis, and distinguishes between 2 categories of foods; foods supporting the growth of *L. monocytogenes*, and foods which not. Regarding the former, *L. monocytogenes* should not be detected in 25 gram at the time of production, while in the latter, *L. monocytogenes* levels should be < 100 cfu per gram at the time of consumption, and therefore throughout the shelf life of the commodity. SCF supported the recommendations of SCVPH.

Recently, a Draft Regulation on microbiological criteria adopted by the Commission of the European Communities [6] included the above microbiological considerations given by SCVPH, and took into account other aspects, such as the type of population (high risk population), sampling plan or actions in case of unsatisfactory results. In this Draft, for the food category *ready-to-eat foods able to support growth of L. monocytogenes other than those intended for infants and young children and ready-to eat-foods for special medical purposes*, two possible microbiological criteria are proposed, and the application of either depends on the demonstration or not by the

manufacturer that the food product will not exceed the limit 100 cfu/g throughout the shelf-life; a non demonstration will lead to the microbiological criterion of absence in 25 g at the stage products ready to be placed on the market.

Given the prevalence of *L. monocytogenes* in different foods reported by SCVPH [5], reaching 36% in minced meat, 52% in meat products, 60% in fish products or 12% in salads, food industries may be interested in demonstrating that despite the presence of *L. monocytogenes* in the product (frequently at low numbers), its level will not exceed 100 cfu/g at the end of the shelf-life.

The Draft Regulation on microbiological criteria mentioned above states in its article 3(2) that, when necessary, the food business operators responsible for the manufacture of the product shall conduct studies in accordance with Annex 11 in order to investigate the compliance with the criteria throughout the shelf-life. This Annex establishes that these studies may include predictive mathematical modelling and tests to investigate the growth or survival under reasonably foreseeable conditions.

In this work, the application of quantitative models by means of computing skills together with the use of internet skills is proposed in order to demonstrate that criteria established for *L. monocytogenes* throughout the shelf-life of ready-to-eat foods are accomplished.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Growth kinetics of *L. monocytogenes*

Levels of *L. monocytogenes* were calculated through the Eq. (1), or equation of population dynamics.

$$LN(N) = LN(N_0) + \mu \cdot t \quad (1)$$

where N = number of microorganisms at the end of the exponential phase (cfu/g); N_0 = number of microorganisms at the beginning of the exponential phase (cfu/g); μ = maximum specific growth rate (h^{-1}); t = time, or shelf-life (h).

The values of shelf-life ranged from 24 to 336 h (24 h-step). The kinetic parameter *maximum specific growth rate* (μ) described by Baranyi and Roberts [7] was obtained through the use of a predictive model taken from

Pin et al. [8]. Two factors were included in the model: temperature and carbon dioxide concentration. For temperature, a probability distribution in domestic refrigerators was used [9], and for carbon dioxide concentration, values ranging from 0 to 80% (10%-step) were considered. In order to obtain probability distribution of levels of *L. monocytogenes* at both beginning (N_0) and end of the shelf-life (N), simulations were carried out with Palisade @Risk Professional© software (Newfield, NY USA). The simulation included 10,000 iterations.

The lag phase of the microorganism was not included in the growth model, as it was assumed that in some scenarios, such as when *L. monocytogenes* is present in salads, there would be none.

2.2 Growth data in food

Growth data in food was taken from the database ComBase [10]. The food selected was endives [11], in which only temperature and carbon dioxide concentration were monitored. In order to obtain the kinetic parameter μ , the model proposed by Baranyi and Roberts [7] was fitted to the growth data through the DMFit v.2 Excel add-in (Norwich, UK) [7].

The accuracy factor (A_i) and bias factor (B_i) proposed by Ross [12] enabled the assessment of the reliability of the predictive model of Pin et al. [8] when compared to growth data in endives. The kinetic parameter assessed was μ .

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Calculation of the level of *L. monocytogenes* just after the manufacture process

By considering the level of 100 cfu/g at the end of the shelf-life (N), a probability distribution of the level of *L. monocytogenes* at the beginning of the shelf-life (N_0), i.e. just after the manufacture, was obtained for every condition. Approximately, 18% of conditions presented levels higher than 1 cfu/g in the 95% percentile. For example, at 70% CO₂ and 96 h-shelf-life, 95% percentile was 13 cfu/g.

When trying to analyze the output (N_0), we came up with two drawbacks of this kind of study: (1) approximately, 82% of conditions presented values between 0 and 1, which are unrealistic, even though they could be modelled;

for instance, it is not possible that 0.02 cfu/g can grow exponentially until reaching 100 cfu/g at the end of the shelf-life; and (2) the 95% percentile value corresponded to a very low temperature (3.49°C, i.e. 5% percentile of temperature distribution); this approach involves a potentially hazardous situation, as the temperature of the majority of domestic refrigerators is above 3.49°C. In the example above, at 70% CO₂ and 96 h-shelf-life, 13 cfu/g. will lead to >100 cfu/g at the end of the shelf-life when the storage temperature is 3.49°C or higher.

For this reason, it is proposed a study taking as a starting point several levels of *L. monocytogenes* just after the manufacture process (N_0) and assessing if the target level 100 cfu/g (N) will be reached or not.

3.2 Calculation of the level of *L. monocytogenes* at the end of the shelf-life

Predictive model

Taking as a starting point several levels of *L. monocytogenes* just after the manufacture (N_0), the 95% percentile of the level N of *L. monocytogenes* in all conditions was above 100 cfu/g. What is more, with a starting level of 10 cfu/g (minimum level detected) the target value 100 cfu/g corresponded to percentiles within the range 0-5% percentile in 78.5% conditions (99 out of 126 conditions).

With these results, it seems very difficult to accomplish with the microbiological criterion 100 cfu/g at the end of shelf-life. However, due to the use of a predictive model performed in laboratory with challenge tests in broth culture, it is possible that the model could be conservative.

Endives growth data

The indices B_f (4.36) and A_f (4.74) deviate very much from the ideal value 1 (perfect concordance between observations and predictions), assessing that the model is very conservative for the type of food considered, i.e. a fail-safe model. Such values of the indices could be in part due to the better growth of *L. monocytogenes* at high CO₂ concentrations in endives as a consequence of a reduction in levels of competing aerobic bacteria, as stated by Carlin et al. [11]. This fact highlights the importance in selecting properly the factors that influence the growth of the pathogen.

Therefore, the kinetic parameter μ obtained from endives at 10°C was directly entered in Eq. (1) to assess if the level 100 cfu/g was reached at the

end of the shelf-life or not. Results are shown in Fig. 1 for a starting level of 10 cfu/g. Only 9 out of 42 conditions presented a level of *L. monocytogenes* below 100 cfu/g at 10°C. However, this fact should not discourage manufacturers, as the advantage of this study is based on the no obligation of performing absence of *L. monocytogenes*; its presence is allowed, as long as 100 cfu/g is not reached at the end of shelf-life by controlling the factors CO₂ and shelf-life, although the quantification of the initial level is crucial for this study.

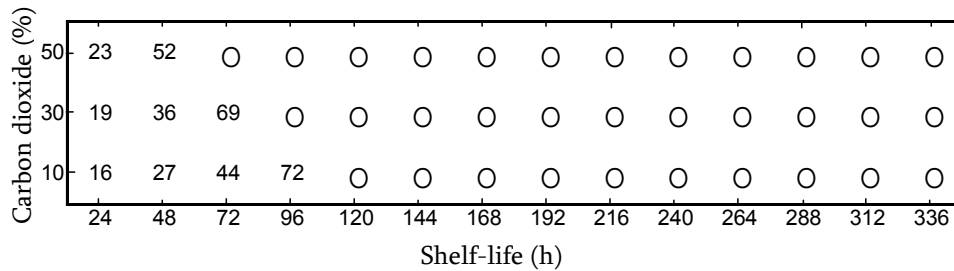


Fig. 1 Level of *L. monocytogenes* at the end of shelf-life (*N*) stored at 10 DC. Levels are given in cfu/g. Circles represent those conditions in which the level was undesirable, i.e. higher than 100 cfu/g.

4. CONCLUSIONS

Food industries which produce endives with certain prevalence of *L. monocytogenes* can still place the product on the market as long as they apply values of factors which lead finally to levels less than 100 cfu/g.

By means of predictive modelling, manufacturers could demonstrate, to the satisfaction of the competent authority, that the product will not exceed the microbiological criterion throughout the shelf-life.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been performed in the framework of the collaboration between Michigan State University and University of Córdoba. The support of the projects CAL01-032 from INIA and AGL 2001-2435 from MYCT, are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] Codex alimentarius (http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp) Ref. CAC/GL 21 (1997).
- [2] E.G.D. Murray, R.A. Webb and SM.B.R. Swann, *Journal of Pathology and Bacteriology*, **29**, 407 (1926).
- [3] Council Directive 92/46/EC, *Official Journal N° L* **268**, 1 (1992).
- [4] Scientific Committee on Food (SCF) (http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out63_en.pdf) (2000).
- [5] Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH) (http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf). (1999).
- [6] Draft Commission Regulation on microbiological criteria for foodstuff. SANCO/4198/2001 Rev. 12 (PLSPV/2002/3665/3665R6-EN.doc) (2004).
- [7] J. Baranyi, and T.A. Roberts, *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 277 (1994).
- [8] C. Pin, G.D. García de Fernando, J.A. Ordóñez, and J. Baranyi, *Food Microbiol.*, **18**, 539 (2001).
- [9] I. Azevedo, M. Regalo, C. Mena, G. Almeida, L. Carnerio, P. Teixeira, T. Hogg, and P.A. Gibbs P. A., *Food Control*, **16**, 121 (2005).
- [10] J. Baranyi, and M.L. Tamplin, *J. Food Prot.*, **67**, 1967 (2004).
- [11] F. Carlin, C. Nguyen-The, A. Abreu Da Silva, and C. Cochet, *Int. J. Food Microbiol.*, **32**, 159 (1996).
- [12] T. Ross, *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 501 (1996).

CAPÍTULO 5. CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ENSALADAS DE IV GAMA

RESUMEN

En la comercialización de ensaladas de IV gama, siempre existe una fase de almacenamiento en mercados o puntos de venta, de transporte y de almacenamiento en frigoríficos domésticos. En el caso de que las ensaladas estuvieran contaminadas por *L. monocytogenes*, el patógeno podría proliferar y alcanzar niveles peligrosos durante estas fases.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el crecimiento de *L. monocytogenes* en lechuga de IV gama (principal ingrediente de las ensaladas de IV gama) envasada con atmósfera modificada. El crecimiento observado en este estudio es de enorme importancia para estimar el número de células de *Listeria* ingeridas en el momento de consumo. Este es el resultado de la fase de evaluación de la exposición de una ER. Además, los resultados de este trabajo son de gran valor para los fabricantes de ensaladas de lechuga de IV gama que deban llevar a cabo una demostración como la presentada en el capítulo anterior.

Esta investigación ha puesto de manifiesto que *L. monocytogenes* crece moderadamente en lechuga iceberg de IV gama envasada con atmósfera modificada (MAP), y almacenada a 13 y 5°C durante 14 días. Las tasas máximas de crecimiento (Gr_{max}) fueron 0,019 y 0,013 \log_{10} ufc/h, respectivamente, y los incrementos microbianos, 5,85 y 2,66 \log ufc/g, respectivamente. No se observó fase de adaptación a 13°C, al contrario de lo que ocurrió a 5°C, donde se observó una fase de adaptación muy prolongada (5,6 días). La composición inicial de gases fue: 4,65-6,2% CO_2 , 2,1-4,3% O_2 y balance de N_2 . Se estudió la capacidad predictiva de cinco modelos de crecimiento de *L. monocytogenes* disponibles en la literatura, observando que las predicciones fueron conservadoras a 13°C, y mucho más cercanas al crecimiento observado a 5°C. Esto último podría deberse al crecimiento similar de *L. monocytogenes* en caldo y en alimento bajo condiciones limitantes para el crecimiento, baja temperatura en este caso. Téngase en cuenta que los modelos predictivos suelen basarse en datos de crecimiento en caldo de cultivo. Por otra parte, la flora alterante estudiada, bacterias ácido lácticas y psicrotrofos, mostraron tasas de crecimiento muy similares a la misma temperatura. Se concluye que la atmósfera modificada estudiada en

este trabajo, retardó el crecimiento de *L. monocytogenes* (mayor fase de adaptación y menor tasa de crecimiento) y aumentó la densidad máxima de población en el producto, en comparación con otros trabajos en los que no se empleó inyección de gases en el producto.

La siguiente publicación recoge el trabajo presentado:

Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce

E. Carrasco , F. Pérez-Rodríguez, A. Valero, R. M. García-Gimeno , and G. Zurera

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba,
Campus Rabanales, Edificio Darwin – Anexo. C.P. 14014. Córdoba, Spain.

Food Control 2007. In press

GROWTH OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* ON READY-TO-EAT ICEBERG LETTUCE

ABSTRACT

Listeria monocytogenes, when present, could be able to grow on Ready-to-Eat (RTE) iceberg lettuce. This investigation demonstrates that *L. monocytogenes* grows on packaged shredded iceberg lettuce held at 13 or 5°C (maximum growth rate of 0.019 and 0.013 log cfu/h, respectively), with increments of 4.85 and 2.66 log cfu/g, respectively, after 14 days. No lag time was observed at 13°C, in contrast with that at 5°C (5.6 days). Initial atmosphere inside the packages was 4.65-6.2% CO₂, 2.1-4.3% O₂ and a balance of N₂. Five predictive models taken from literature gave conservative predictions at 13°C, although at 5°C they were closer. Lactic acid and psychrotrophic bacteria showed similar growth at both temperatures. In general, the MAP system reported here retarded the growth of *L. monocytogenes* in comparison with other works without initial flushing of gases.

Keywords: MAP; predictive microbiology; indigenous flora.

1. INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen of particular concern for manufacturers of refrigerated Ready-to-Eat (RTE) foods because of its wide distribution in the environment, its ability to grow at refrigeration temperatures and at the low O₂ levels often used to extend the shelf life of RTE foods, and its wide variety of human disease manifestations, which range from a non-specific flu to severe illnesses such as sepsis and meningitis (Szabo, Simons, Coventry & Cole, 2003).

Vegetables have been reported to be contaminated by *L. monocytogenes* (De Simón, Tarragó & Ferrer, 1992; Francis, Thomas & O'Beirne, 1999; Szabo, Scurrah & Burrows, 2000). Unfortunately, it has been demonstrated that industrial process rendering RTE vegetables like sanitized washing, do not guarantee the total elimination of the pathogen when present (Nguyen-The & Carlin, 1994; Szabo et al., 2000). Considerable research has been performed in relation to disinfectants and solutions which reduce a hypothetical load of *Listeria* cells (Beuchat, Adler & Lang, 2004; Burnett, Iturriaga, Escartin, Pettigrew & Beuchat, 2004; Zhang & Farber, 1996), but no treatment has been shown to eliminate completely, as it has been reported in prevalence studies of *L. monocytogenes* (García-Gimeno, Zurera-Cosano & Amaro-López, 1996; Sizmur & Walker, 1988; Szabo et al., 2000).

Modified Atmosphere Packaging (MAP) has been successfully and widely used for whole and minimally processed fruits and vegetables, as a packaging strategy for maintenance the product safety and extension of shelf-life (Werner & Hotchkiss, 2006). MAP system generally utilizes an internal package atmosphere of something other than air in a hermetically sealed package of suitable permeability. While other gases have been explored for use in MAP systems, O₂, CO₂ and N₂ are the most commonly employed; O₂ levels are commonly reduced below and CO₂ increased above atmospheric levels (with a balance of N₂) in order to reduce the commodity respiration rate, retard ripening and senescence, and reduce microbial activity. MAP technology suppresses the growth of most indigenous flora; this fact, along with the intrinsic characteristics of many vegetables, i.e. neutral pH and high water activity, may enhance the growth of *L. monocytogenes* (Francis & O'Beirne, 1998a).

RTE lettuce is one of the most popular RTE vegetables consumed; the extended consume of this product together with the reasons above, justify the need for studying the behaviour of *L. monocytogenes* in RTE lettuce.

Although various studies deal with the growth of this pathogen on lettuce (Francis & O'Beirne, 1997; Francis & O'Beirne, 1998b; Koseki & Isobe, 2005b; Szabo et al., 2003), to our knowledge, no growth data on RTE lettuce under MAP initially flushed with a mixture of CO₂, O₂ and N₂ gases, are available. Studying the behaviour of *L. monocytogenes* on RTE lettuce (and in general, on RTE vegetables) becomes highly relevant, as it does not require decontamination practices such as washing at retail, foodservice or consumer stage, which could reduce a potential contamination of the microorganism.

Large amount of work has been done in relation to growth models of *L. monocytogenes* (Buchanan & Phillips, 1990; Fernández, George, Sills & Peck, 1997; McClure, Beaumont, Sutherland & Roberts, 1997). However, when assessing their performance in foods, it is often found that they overestimate the growth of *L. monocytogenes*, as the majority of them have been built from data obtained in broth challenge experiments in the laboratory. Only recently, the work of Koseki et al. (2005b) introduced a very good approximation to the growth of *L. monocytogenes* on iceberg lettuce.

The objectives of this work were: (i) to study the growth of *L. monocytogenes* on shredded, RTE iceberg lettuce under MAP (with initial flushing of a mixture of gases), along with the growth of psychrotrophic and Lactic Acid Bacteria (LAB) at 13 and 5°C; and (ii) to test the performance of various predictive models available in literature in this food category.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Samples and experimental design

A local factory provided bags of 150 grams-RTE shredded iceberg lettuce at the day of production. At the factory, shredded lettuce was packaged under modified atmosphere in heat-sealed oriented polypropylene plastic film (oxygen transmission rate: 1200 cc/m²/24 h). The bags were transported to the laboratory, and were kept at 4°C until inoculation. Approximately, 2-2.5 hours elapsed from the reception of bags until they were inoculated. Once inoculated, the bags were stored at 13 and 5°C during 14 days (time exceeding the usual shelf-life applied to RTE lettuce), and then withdrawn at proper intervals in order to be analyzed. Seven bags were analyzed at each analysis point. The two challenge temperatures tested in this work were selected taking into account the following: 5°C is the usual storage temperature

recommended and written on the label of the package of RTE lettuce (and other chill foodstuff); 13°C is an abuse temperature.

2.2. Preparation of inoculum

Listeria monocytogenes serovar 4b (ATCC 13932) was selected to perform this challenge test on the basis of the well recognized pathogenesis of 4b serovar. It was provided by CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). From a previous assay in which two strains serovar 4b were challenged at 8°C (the two supplied by CECT: ATCC 13932 and NCTC 11994), no significant differences in growth was observed (data not shown). Therefore, the most recognized strain by other culture collections, i.e. the strain ATCC 13932, was used in our experiments.

A freeze-dried culture of this strain was reconstituted by following the instructions given by CECT. After 24 hours it was subcultured in BHI (Brain Heart Infusion) and kept at 37°C until reaching the early stationary phase (\approx 15 hours). Then, it was serially diluted in 0.1 % peptone water so as to obtain two 100 ml-flasks containing BHI with the same concentration of cells, i.e. 100 cfu/ml, approximately. This concentration was verified by plating on Oxford agar medium (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) and Palcam agar medium (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). Both flasks were stored at 7°C, and *L. monocytogenes* was left to grow until the end of exponential phase, which occurred after 96 hours approximately. During the time of growth, *L. monocytogenes* level was daily monitored in one of these flasks. The other flask served as the source of cells to inoculate the bags of RTE lettuce. After \approx 5-days storage at 7°C, necessary dilutions were performed in sterile saline solution in order to inoculate \approx 10³ cfu/g in every bag of lettuce. This level was also verified by plating on Oxford and Palcam media.

2.3. Inoculation of bags

The bags of RTE lettuce were inoculated with 1 ml of the saline solution obtained above with the aid of sterile 1-ml syringes and 0.5 mm \times 16 mm needles (Becton Dickinson, Drogheda, Ireland) through adhesive butyl rubber septa. These septa were stuck on a corner of the package delimited with a marker. In this way, the inoculated pieces of shredded lettuce were located, and in the analyses, a portion of shredded lettuce from that corner (\approx 25g) containing *Listeria* cells, was withdrawn. This portion constituted the analytical unit, and the rest of lettuce was discarded. The enumeration

analysis when the study was initiated (just after inoculation) evidenced that the inoculum size injected was fully recovered. This method lets collect the cells inoculated, as checked by the authors in a previous essay with different analytical unit sizes, i.e. 25 g, 150 g (the whole content of the bags) or 200 g (data not shown).

2.4. Microbiological analyses

Listeria monocytogenes, Lactic Acid Bacteria (LAB) and psychrotrophic bacteria were counted on 5 samples at each analysis time. Mesophilic microorganisms were also enumerated when the study was initiated. In parallel, 2 control samples were also analyzed for the presence of *L. monocytogenes* at each analysis time. For the analyses, ≈25 grams of lettuce from each bag was added to 225 ml of 1%-peptone solution in sterile Stomacher bags (Interscience, St. Nom, France) and subjected to homogenization at 260 rpm for 2 min in a Stomacher (Stomacher 400, Seward Medical Limited, London, UK). The suspension was serially diluted in 0.1%-peptone solution tubes, and aliquots were withdrawn and plated in duplicate as needed. For the inoculated samples, counts of *L. monocytogenes* were estimated by following the EN/ISO 11290-2 enumeration method, as recommended by the Commission Regulation (EC) N° 2073/2005 on microbiological criteria on foodstuffs: 0.1 ml-aliquot was plated on Palcam (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), and incubated at 37°C for 48 h. LAB were counted using a pour plate method with de Man Rogosa Sharper agar (MRS; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England); plates were incubated at 30°C for 48 h under 10% carbon dioxide (CO₂) atmosphere. Psychrotrophic bacteria were enumerated by plating 0.1 ml-aliquot on Plate Count Agar (PCA; Oxoid Ltd., Hampshire, England), and incubated during 10 days at 7 ± 1°C, recommendations given by Gaitán (2001). For mesophilic bacteria, 0.1 ml-aliquot was plated on PCA, and incubated at 30°C for 24 h. The investigation of *L. monocytogenes* in control samples was carried out following the directions of the EN/ISO 11290-1 detection method, also recommended by the Commission Regulation (EC) N° 2073/2005.

2.5. Gas analysis and measurement of pH

Throughout the experiment, carbon dioxide (CO₂), oxygen (O₂), and nitrogen concentrations within bags were analyzed by means of a Gas Headspace Analyser (Gaspacer 2, Systech Instruments Ltd., Oxon, UK). Also,

the pH was measured in a blended control sample 1:5 diluted in distilled water with the aid of a Crison pH_{meter} (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

2.6. Modelling of growth data

Counts of microorganisms were log-transformed, and introduced in Excel spreadsheet along with time (raw growth data). The primary growth model of Baranyi and Roberts (1994) was fitted to the raw growth data by means of DMFit excel Add-In (kindly provided by J. Baranyi, Institute of Food Research, Norwich, UK), which calculated estimates of 3 kinetic parameters, i.e. lag time (λ , expressed in days in this paper), maximum growth rate ($G_{r_{max}}$, expressed in log cfu/h) and maximum cell numbers (y_{end} , expressed in log cfu/g). Let's point out that we will use $G_{r_{max}}$ throughout the paper, which is different from the maximum specific growth rate (μ_{max}), expressed in ln cfu/h. The parameter y_{end} represents the upper asymptote of the predicted sigmoid growth curve; however, some curves did not reach this asymptote, i.e. the stationary phase; in these cases, it will be reported the maximum predicted data point (y_{max} , expressed in log cfu/g).

Also, the growth model behind ComBase Predictor (<http://www.combase.cc>) (C-P), at static and dynamic CO₂ %, the one provided by Pin, García de Fenando, Ordóñez and Baranyi (2001) (P), the model of Farber, Cai and Ross (1996) (F), the Gamma concept (Zwietering, Dewit & Notermans, 1996) (G) and that of Koseki and Isobe (2005a) (KI) were implemented in Excel spreadsheet to give predictions for the growth of *L. monocytogenes* on lettuce. For predictions of C-P at static CO₂ conditions, the initial values of CO₂ % observed in the samples were introduced, while at dynamic CO₂ conditions, the CO₂ % of the samples *vs* time, was introduced. It should be noted that C-P, when used on the Internet, provides an estimate of $G_{r_{max}}$, doubling time, and several data points (log counts) along the observation time previously fixed by the user. So, to get values of λ and y_{end} or y_{max} , the data points predicted were introduced in spreadsheet to obtain an estimation of these kinetic parameters by means of DMFit.

3. RESULTS

3.1. Growth of *Listeria monocytogenes* and predictions

A total of 58 control samples were analyzed. None of them was positive for the presence of *L. monocytogenes*.

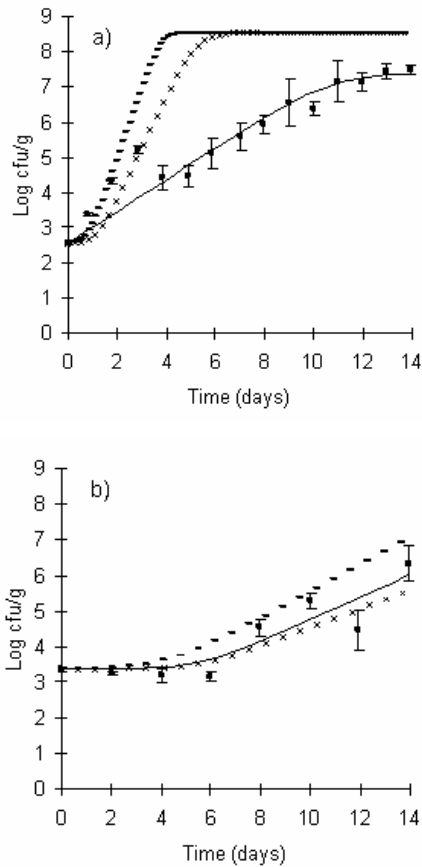


Figure 1. Behaviour of *Listeria monocytogenes* on RTE lettuce (■), fitting of Baranyi model to log counts by DMFit (—), and predictions by ComBase Predictor at dynamic CO₂ % (- -) and static CO₂ % (×), stored at 13°C (a) and 5°C (b). Reported populations represent means of five values. Error bars show SD.

Regarding inoculated samples, Figure 1 represents the behaviour of *L. monocytogenes* on RTE shredded lettuce stored at 13 and 5°C. Table 1 shows the kinetic parameters provided by DMFit as well as the kinetic parameters predicted by C-P (at static and dynamic CO₂ %), KI, F, P and G.

Table 1. Kinetic parameters of *Listeria monocytogenes* estimated by fitting Baranyi model to growth data on RTE lettuce (DMFit estimation) at 13 and 5°C, and kinetic parameters predicted by ComBase Predictor at static and dynamic CO₂ % (C-P Static CO₂ and C-P Dynamic CO₂, respectively), and by the models of Koseki et al. (2005b) (KI), Farber et al. (1996) (F), Pin et al. (2001) (P), and the Gamma concept (Zwietering, et al., 1996) (G).

<i>t</i> T	DMFit estimation			C-P Static CO ₂			C-P Dynamic CO ₂			KI	F	P	G	
	<i>b</i> λ	<i>a</i> Gr _{max}	<i>a</i> y _{end} / <i>a</i> y _{max}	λ	Gr _{max}	y _{end} /y _{max}	λ	Gr _{max}	y _{end} /y _{max}					Gr _{max}
13	0	0.019	^a 7.40	1.2	0.062	^a 8.52	0.8	0.087	^a 8.51	0.076	^a 5.6	0.065	0.123	0.081
5	5.6	0.013	^a 6.34	5.3	0.010	^a 5.55	3.9	0.015	^a 6.90	0.022	^a 5.5	0.024	0.023	0.018

^aTemperature (°C)

^bLag time (days)

^cMaximum growth rate (log cfu/h)

^dPredicted upper asymptote of the sigmoid curve (log cfu/g)

^eMaximum predicted data point (log cfu/g)

Table 2. Kinetic parameters of Lactic Acid Bacteria (LAB) and psychrotrophic bacteria estimated by fitting Baranyi model to log counts (DMFit estimation) at 13 and 5°C.

<i>t</i> T	LAB			Psychrotrophic bacteria		
	<i>b</i> λ	<i>a</i> Gr _{max}	<i>a</i> y _{end}	<i>b</i> λ	<i>a</i> Gr _{max}	<i>a</i> y _{end}
13	0	0.021	7.33	0	0.020	8.33
5	0	0.015	5.62	0	0.017	8.14

Letters *a*, *b*, *c* are as in Table 1

At 13 °C, *L. monocytogenes* presented a rapid growth with no lag time, as can be seen in Figure 1.a. It is especially interesting the two growth phases observed; until ≈ 3 days storage, *L. monocytogenes* experimented a rapid growth (almost 3 log-increment), after which cells submit 1 log decay, and then, recover and grow at a lower rate than just before, until reaching a y_{end} of 7.40 towards the 13th day (4.85 log cfu/g increment in total). DMFit, which fits the Baranyi model assuming a well established 3 phases-curve, estimated only one Gr_{max} for the whole curve, being 0.019 log cfu/h. All predictive models gave extremely conservative predictions of kinetic parameters, being the models C-P (at static CO₂ %) and F the ones whose predictions closed the most, although still very far from growth on lettuce.

At 5°C, the growth of *L. monocytogenes* was lower than at 13°C. It took 5.6 days to start to grow, and then, *L. monocytogenes* grew at a Gr_{max} of 0.013 log cfu/h, until reaching a y_{max} value of 6.00 log cfu/g (2.66 log cfu/g increment) in 8.4 days. All predictive models performed quite well at 5°C, as can be observed in Table 1. The C-P model was the one which best predicted better the behaviour of *L. monocytogenes* at 5°C.

3.2. Growth of indigenous microflora

Figures 2 and 3 show the fate of LAB and psychrotrophic bacteria, respectively, at 13 and 5°C. Table 2 indicates the kinetic parameters provided by DMFit for both LAB and psychrotrophic bacteria.

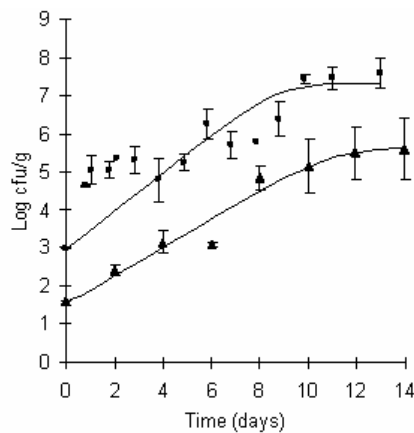


Figure 2. Behaviour of Lactic Acid Bacteria (LAB) on RTE lettuce stored at 13°C (■) and 5°C (▲), and fitting of Baranyi model to log counts by DMFit (—). Reported populations represent means of five values. Error bars show SD.

As can be seen in Figures 2 and 3, and in Table 2, LAB as well as psychrotrophic bacteria grew at the two temperatures with absence of λ .

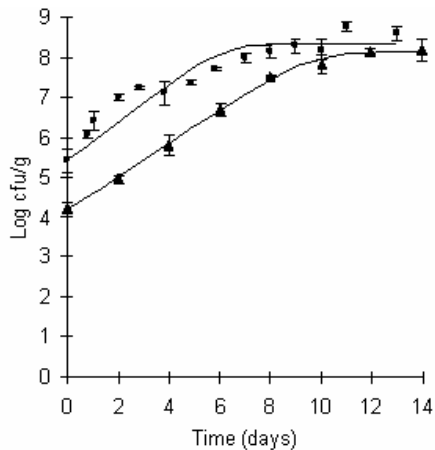


Figure 3. Behaviour of psychrotrophic bacteria on RTE lettuce stored at 13°C (■) and 5°C (▲), and fitting of Baranyi model to log counts by DMFit (—). Reported populations represent means of five values. Error bars show SD.

A slight difference in growth was observed between the two temperatures in both groups of microorganisms, being the G_{max} at 13°C greater than at 5°C (Table 2). The stationary phase was reached at both temperatures, and yend values were estimated (Table 2).

3.3. Change of physicochemical parameters

Figures 4.a and 4.b represent the CO₂ % and O₂ % change, respectively, along the experiment. Fig. 4.a shows a general increasing trend of CO₂ %, while Fig. 4.b shows a global decreasing trend in O₂ % change. It was not observed an appreciate variation in pH along the study at any of the temperatures tested. The range of pH measured was 6.9-7.8 at 13°C, and 7.1-8 at 5°C, without obeying any particular trend. All these values are neutral or close to neutral, so it is concluded that growth of *L. monocytogenes* was not influenced by pH.

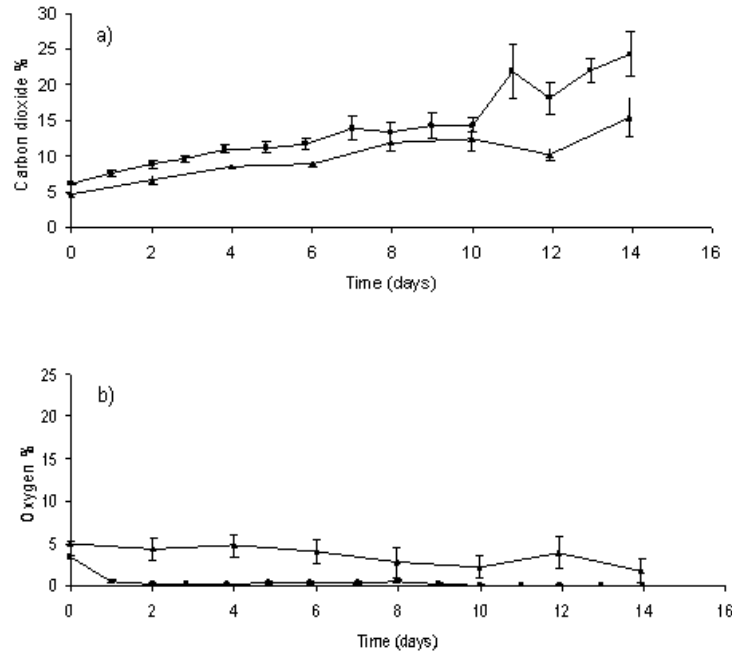


Figure 4. Evolution of CO₂% (a) and O₂% (b) inside the packages of lettuce throughout the experiment at 13°C (■) and 5°C (▲). Reported populations represent means of five values. Error bars show SD.

4. DISCUSSION

4.1. Growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce and predictions at 13 and 5°C

L. monocytogenes was submitted to low-temperature subculture before inoculation, in contrast with the recommendations given by Scott et al. (2005). These authors suggested that challenge cultures should be grown under conditions that provide organisms in a state that is representative of the product being produced or representative of the probable sources of environmental contamination. In this study, it was assumed that *L. monocytogenes* is adapted to low temperatures (7°C) due to either (i) refrigerated storage of lettuce heads contaminated in the field, before being processed, or (ii) contamination at the processing plant (by contaminated surfaces, washing water or handlers), being the temperature inside the plant set at refrigeration.

This study has shown an important extension of growth of *L. monocytogenes* at 13°C on RTE lettuce under the studied MAP system, increasing 3 log cfu/g after 7 days, and a total of 4.85 log cfu/g after 14 days, with no lag time. Other authors such as Steinbruegge, Maxcy and Liewen (1988), reported 2 log cfu/g and slightly over 3 log cfu/g increment of *L. monocytogenes* after 7 and 14 days at 12°C on lettuce packaged in sealed plastic bags (without initial flushing of gases). The initial inoculation level was 10³ cfu/g. Koseki et al. (2005b) obtained an increment of 1.5 log cfu/g in the level of a cocktail of *L. monocytogenes* after 37 h and ≈6.22 days at 15°C and 10°C, respectively on shredded lettuce packaged (without initial flushing of gases), and without being treated with any sanitizer. The initial inoculum level was ≈10³-10⁴ cfu/g. In contrast with our results, Koseki et al. (2005b) observed lag time at 15 and 10°C (10.2 and 45.6 h at, respectively), and obtained higher Gr_{max} (0.090 and 0.047 log cfu/h at 15 and 10°C, respectively) than that of the present study at 13°C (0.019 log cfu/h). From these considerations, it can be withdrawn that *L. monocytogenes* grows relatively low and reaches high y_{end} levels (7.4 log cfu/g) on RTE lettuce under the studied MAP system, in comparison with results obtained on RTE lettuce without initial flushing of gases. Beside this, no lag time was found at 13°C, possibly due to both the favourable temperature to grow and the adaptation of the inoculum at 7°C.

Regarding the form of the growth curve obtained at 13°C, i.e. two growth rates pattern, no growth curves of *L. monocytogenes* with this pattern have been reported up to now, to our awareness. The two growth rates pattern has been observed in other tests with other microorganisms. A possible explanation for this could reside in the utilization de novo of nutrients when microorganisms starve, that is: microorganisms initially utilize certain convenient nutrients, describing lag phase, exponential phase, and when these nutrients are totally consumed, a stationary and even decline phase; then, the exhausted microorganisms develop internal mechanisms (that were lacked before) to synthesize substances and utilize other nutrients, so microorganisms re-start to grow.

At 5°C, the growth of *L. monocytogenes* is much more retarded than at 13°C, presenting a lag time of 5.6 days. A total increment of 2.66 log cfu/g was observed, and y_{end} was not reached, but y_{max} (6.00 log cfu/g). Other studies have reported lower increments than that of our study at the same temperature. Steinbruegge et al. (1988) reported doubled population of *L. monocytogenes* after 7 days at 5°C and slightly over 1 log cfu/g growth after

14 days on lettuce packaged as stated before. Corroborating this, García-Gimeno et al. (1996), in their study of growth of *L. monocytogenes* at 4°C in RTE mixed vegetable salads (75% lettuce, 15% carrot and 10% red cabbage), found that *L. monocytogenes* barely grew 1 log cfu/g during a period of 12.5 days, being the salads packaged in polypropylene plastic film without gas injection. Szabo et al. (2003), in their study dealing with growth of *L. monocytogenes* on RTE iceberg lettuce (without initial flushing of gases), found increments of 1.0 ± 0.34 and 1.1 ± 0.37 log cfu/g at 4°C at days 7 and 14, respectively. Likewise, Koseki et al. (2005b) obtained at 5°C an increment of ≈ 1.2 log cfu/g on RTE iceberg lettuce packaged as mentioned before, reaching the y_{end} (4.95 ± 0.09 log cfu/g) after ≈ 5.6 days. They reported shorter lag time (2.5 days) and higher Gr_{max} (0.021 log cfu/h) than those reported in this study at the same temperature; what is more, that Gr_{max} of 0.021 log cfu/h is even higher than that of the present study at 13°C (Table 1).

In general, our results showed that the extension of growth of *L. monocytogenes* at 5 °C was relatively high, in comparison with other works in which RTE lettuce was packaged without initial flushing of gases. However, in our experiment, the lag time was longer and Gr_{max} smaller when contrasting with other studies, like that of Koseki et al. (2005b) at 5°C.

The good performance of predictive models at 5°C was possibly due to the similar behaviour of *L. monocytogenes* in broth (in general, predictive models are broth-based) and food matrix at limiting conditions to grow, i.e. low temperature in this case. KI model, which was lettuce-based, gave a close prediction at 5°C, but not as exact as C-P model.

4.2. Behaviour of indigenous flora on lettuce and predictions at 13 and 5°C

In this study, batches of RTE shredded lettuce presented an initial concentration between 5.1-6.4 log cfu/g for mesophilic bacteria. Accordingly, other authors have reported microbial densities between 10^4 and 10^6 cfu/g (Barriga, Trachy, Willemot & Simard, 1991; Garg, Churey & Splittstoesser, 1990; King, Magnuson, Torok & Goodman, 1991; Marchetti, Casadei & Guerzoni, 1992). The effect of initial background bacteria level on the subsequent growth of *L. monocytogenes* has been controversial. Some authors have found this effect to be null (Francis et al., 1998b; Gleeson & O'Beirne, 2005; Nguyen-The et al., 1994), whilst others have reported it to occur (Carlin, Nguyen-The & Morris, 1996; Francis et al., 1997). Francis et al. (1998b) pointed out that this effect was observed in the cases where low

initial background levels were achieved by washing the product with disinfectant water. Then, a reduction of key competitive subpopulations of the microflora (for example, LAB or *Enterobacter* spp) occurred, and this “selective” reduction may be more important than the overall reductions in numbers, and, consequently, the initial population size. According to this, because the samples of this study were provided by one factory (same disinfection treatment for all samples), it was assumed that the different initial microflora levels of the samples did not influence the growth of *L. monocytogenes*.

Initial concentrations of LAB and psychrotrophic bacteria were 1.6-3 and 4.2-5.4 log cfu/g, respectively. These initial loads are consistent with those reported by others authors (García-Gimeno & Zurera-Cosano, 1997; Garg et al., 1990; Valero, Carrasco, Pérez-Rodríguez, García-Gimeno, Blanco & Zurera, 2006).

It is very interesting the practically equal Gr_{max} observed for LAB and psychrotrophic bacteria at each temperature (Table 2). García-Gimeno et al. (1997) found different Gr_{max} for both groups of microorganisms at the same temperature; at 4°C, Gr_{max} was almost double for psychrotrophic bacteria with respect to LAB; at 10°C, the authors found just the opposite, and at 15°C the Gr_{max} of psychrotrophic bacteria was reduced 26% with respect to Gr_{max} of LAB. Because these authors worked with RTE mixed salads without initial flushing of gases, it is logical to think that the CO₂ evolution (increasing trend, and steeper at higher temperature) played a very important role in the fate of these groups of microorganisms. From our results, it is suggested that the modified atmosphere inside the packages may “select” the psychrotrophic bacteria able to grow under such atmosphere, and this “selection” grows at the same rate as LAB does.

4.3. Modified atmosphere influence on the growth of microorganisms

The gas composition found in this study (4.65-6.2% CO₂, 2.1-4.3% O₂ and a balance of N₂) is in accordance with the recommendation for lettuce given by the Institute of Food Technologists (2001): 0.5-3% O₂ and 5-10% CO₂.

Dissolved CO₂ has been found to inhibit microbial growth (Daniels, Krishnamurthi & Rizvi, 1985; Devlieghere & Debevere, 2000; Devlieghere, Debevere & Van Impe, 1998) affecting λ , Gr_{max} and y_{end} , although not all microorganism strains or species are sensitive to the antimicrobial effect of CO₂ (e.g., *Lactobacillus* spp.). There is no agreement on the effect of CO₂ on

L. monocytogenes; however, generally it has been found that levels of CO₂ = 5-10% do not affect or in some cases enhance its growth, and levels \geq 20% reduce Gr_{max} but not y_{end} (Bennik, Peppelenbos, Nguyen-The, Carlin, Smid & Gorris, 1996; Francis et al., 1998a), and may extend the lag time (Francis et al., 1998a). However, in the present investigation, initial CO₂ levels of 4.65-6.2% decreased Gr_{max} of *L. monocytogenes* (4 and 1.8-fold decrease at 13 and 5°C, respectively), when comparing with the work of Koseki et al. (2005b) (no initial flushing of gases). In change, y_{end} was incremented (evident at 13°C but not at 5°C due to the no completion of the growth curve).

Our results indicate that the MAP system reported here, representative of the gases recommended by experts (Institute of Food Technologists, 2001) retarded the growth of *L. monocytogenes* (greater λ and lower Gr_{max}) an extended the y_{end} or y_{max} on lettuce in comparison with other works dealing with RTE packaged lettuce/salads without initial flushing of gases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Junta de Andalucía and the project CAL 01-032. Dr. Yvan Le Marc (IFR, Norwich, UK) is gratefully acknowledged for his invaluable assistance in ComBase Predictor and behaviour of *L. monocytogenes*.

REFERENCES

- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, *23*, 277-294.
- Barriga, M. I., Trachy, G., Willemot, C., & Simard, R. E. (1991). Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. *Journal of Food Science*, *56*, 1586-1599.
- Bennik, M. H. J., Peppelenbos, H. W., Nguyen-The, C., Carlin, F., Smid, E. J., & Gorris, L. G. M. (1996). Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. *Postharvest Biology and Technology*, *9*, 209-221.
- Beuchat, L. R., Adler, B. B., & Lang, M. M. (2004). Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and

- Romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection*, 67, 1238-1242.
- Buchanan, R. L., & Phillips, J. G. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration, and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 53, 370-376.
- Burnett, A. B., Iturriaga, M. H., Escartin, E. F., Pettigrew, C. A., & Beuchat, L. R. (2004). Influence of variations in methodology on populations of *Listeria monocytogenes* recovered from lettuce treated with sanitizers. *Journal of Food Protection*, 67, 742-750.
- Carlin, F., Nguyen-The, C., & Morris, C. E. (1996). Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Cichorium endivia* var *latifolia*). *Journal of Food Protection*, 59, 698-703.
- Daniels, J. A., Krishnamurthi, R., & Rizvi, S. S. H. (1985). A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, 48, 532-537.
- De Simón, M., Tarragó, C., & Ferrer, M. D. (1992). Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 16, 153-156.
- Devlieghere, F., & Debevere, J. (2000). Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 33, 531-537.
- Devlieghere, F., Debevere, J., & Van Impe, J. (1998). Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 105-113.
- Farber, J. M., Cai, Y., & Ross, W. H. (1996). Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 133-144.
- Fernández, P. S., George, S. M., Sills, C. C., & Peck, M. W. (1997). Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 37-45.

- Francis, G. A., & O'Beirne, D. (1998a). Effects of storage atmosphere on *Listeria monocytogenes* and competing microflora using a surface model system. *International Journal of Food Science and Technology*, *33*, 465-476.
- Francis, G. A., & O'Beirne, D. (1998b). Effects of the indigenous microflora of minimally processed lettuce on the survival and growth of *Listeria innocua*. *International Journal of Food Science and Technology*, *33*, 477-488.
- Francis, G. A., & O'Beirne, D. (1997). Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. *International Journal of Food Science and Technology*, *32*, 141-151.
- Francis, G. A., Thomas, C., & O'Beirne, D. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, *34*, 1-22.
- Gaitán, A. (2001). Psychrotrophic Microorganisms: Agar Plate Methods, Homogenization, and Dilutions. In J. F. T. Spencer, & A. L. Ragout de Spencer, *Food Microbiology Protocols* (pp. 3-10). Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- García-Gimeno, R. M., & Zurera-Cosano, G. (1997). Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, *36*, 31-38.
- García-Gimeno, R. M., Zurera-Cosano, G., & Amaro-López, M. (1996). Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetable salads in Spain. *Journal of Food Safety*, *16*, 75-86.
- Garg, N., Churey, J. J., & Splittstoesser, D. F. (1990). Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*, *53*, 701-703.
- Gleeson, E., & O'Beirne, D. (2005). Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*, *16*, 677-685.
- Institute of Food Technologists and U.S. Food and Drug Administration. (2001). Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-toc.html>.

- King, A. D., Magnuson, J. A., Torok, T., & Goodman, N. (1991). Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. *Journal of Food Science*, *56*, 459-461.
- Koseki, S., & Isobe, S. (2005a). Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. *International Journal of Food Microbiology*, *101*, 217-225.
- Koseki, S., & Isobe, S. (2005b). Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *International Journal of Food Microbiology*, *104*, 239-248.
- Marchetti, R., Casadei, M. A., & Guerzoni, M. E. (1992). Microbial population dynamics in ready-to-use vegetable salads. *Italian Journal of Food Science*, *2*, 97-108.
- McClure, P. J., Beaumont, A. L., Sutherland, J. P., & Roberts, T. A. (1997). Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes* - The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *International Journal of Food Microbiology*, *34*, 221-232.
- Nguyen-The, C., & Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*, 371-401.
- Pin, C., García de Fernando, G. D., Ordóñez, J. A., & Baranyi, J. (2001). Applying a generalized z-value concept to quantify and compare the effect of environmental factors on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, *18*, 539-545.
- Scott, V. N., Swanson, K. M. J., Freier, T. A., Payton Pruett, W. J. R., Sveum, W. H., Hall, P. A., Smoot, L. A., & Brown, D. G. (2005). Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food Protection Trends*, *25*, 818-825.
- Sizmur, K., & Walker, C. W. (1988). *Listeria* in Prepacked Salads. *Lancet*, *1*, 1167-1167.
- Steinbruegge, E. G., Maxcy, R. B., & Liewen, M. B. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. *Journal of Food Protection*, *51*, 596-599.

- Szabo, E. A., Scurrah, K. J., & Burrows, J. M. (2000). Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *Letters in Applied Microbiology*, *30*, 456-460.
- Szabo, E. A., Simons, L., Coventry, M. J., & Cole, M. B. (2003). Assessment of control measures to achieve a food safety objective of less than 100 CFU of *Listeria monocytogenes* per gram at the point of consumption for fresh precut iceberg lettuce. *Journal of Food Protection*, *66*, 256-264.
- Valero, A., Carrasco, E., Perez-Rodriguez, F., Garcia-Gimeno, R. M., Blanco, C., & Zurera, G. (2006). Monitoring the sensorial and microbiological quality of pasteurized white asparagus at different storage temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*, 1281-1288.
- Werner, B. G., & Hotchkiss, J. H. (2006). Modified Atmosphere Packaging. In G. M. Sapers, J. R. Gorny, & A. E. Yousef, *Microbiology of Fruits and Vegetables* (pp. 437-460). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Zhang, S., & Farber, J. M. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*, *13*, 311-321.
- Zwietering, M. H., Dewit, J. C., & Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*, *30*, 55-70.

CAPÍTULO 6. RECOPIACIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS EN ENSALADAS DE IV GAMA

RESUMEN

La escasez de datos para llevar a cabo Evaluaciones del Riesgo es un hecho internacionalmente reconocido y tratado en multitud de reuniones y foros científicos, (p. ej., en las reuniones científicas de la acción europea COST 920, grupo de trabajo 3). En muchas ocasiones, los evaluadores del riesgo asumen datos referidos a poblaciones distintas de la población objeto de estudio. Esto daría un resultado aproximado de la ER, pero no es lo deseable. En la presente tesis se realiza una Evaluación y Gestión del riesgo de *Listeria monocytogenes* en ensaladas de IV gama en la población española, por lo que se hizo necesario recopilar datos referentes al consumo de ensaladas de IV gama y temperatura de los frigoríficos domésticos en España. La recogida de datos se hizo en Córdoba, como una aproximación al consumo y temperaturas en España.

Los resultados de este estudio mostraron que el consumo de ensaladas de IV gama es moderado-bajo. El 24,3% de los encuestados no consumen ensaladas de IV gama; el restante 75,7% se atuvo a la siguiente distribución de frecuencias: 7,41% *más de dos veces a la semana*; 17,28% *una o dos veces a la semana*; 29,63% *una o dos veces al mes*; y 45,68% *ocasionalmente*. Las ventajas que los encuestados encuentran en las ensaladas de IV gama son *ahorro de tiempo y comodidad*. Por otra parte, se detectó que un 9,9% de los consumidores de estas ensaladas no siempre respeta la fecha de caducidad.

En cuanto a las temperaturas de los frigoríficos domésticos, se encontró que la variabilidad de la media de temperaturas sigue una distribución Normal (6,62; 2,56), mientras que la variabilidad de la varianza fue descrita por la distribución Gamma (2,00; 1,00). Como era de esperar, los cambios de temperatura más importantes observados a lo largo de 24 h, se corresponden con los tiempos de día y de noche.

Los resultados de este estudio son cruciales para llevar a cabo una ER de *L. monocytogenes* en ensaladas de IV gama. Además, se evidencia que las temperaturas halladas en los frigoríficos domésticos son perfectamente compatibles con el crecimiento del patógeno, dada su naturaleza psicrotrofa. Por otra parte, el hecho de que el 9,9% de consumidores no siempre respeten la fecha de caducidad, podría suponer un riesgo potencial si se fijan fechas de

consumo preferente en base al crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto.

La siguiente publicación recoge el trabajo presentado:

Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for listeriosis

E. Carrasco , F. Pérez-Rodríguez, A. Valero, R. M. García-Gimeno , and G. Zurera

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba,
Campus Rabanales, Edificio Darwin – Anexo. C.P. 14014. Córdoba, Spain.

Journal of Food Protection 2007. In press

SURVEY OF TEMPERATURE AND CONSUMPTION PATTERNS OF FRESH-CUT LEAFY GREEN SALADS: RISK FACTORS FOR LISTERIOSIS

ABSTRACT

Increasing demand for fresh-cut or ready-to-eat (RTE) fruits and vegetables, developed to meet the consumer need for “quick” and convenient products, has prompted extensive research into their microbiological quality, safety, processing and packaging. The microbial ecology of *Listeria monocytogenes* is recognized as a major safety concern for fresh-cut produce. A survey was performed to collect information on consumption patterns of fresh-cut leafy green salads and the temperature of domestic refrigerators. Salad consumption was low-moderate: 24.3% of respondents never purchased fresh-cut leafy green salads; of those who reported buying these products, 7.41% did so *more than twice a week*, 17.28% *once or twice a week*, 29.63% *once or twice a month* and 45.68% *occasionally*. *Time-saving* and *convenience* were the advantages most widely reported by consumers. A total of 9.9% of respondents did not always respect the “use-by” date of fresh-cut salads, a negative practice that could contribute to the risk of listeriosis. Temperatures reported in domestic refrigerators were compatible with the growth of *L. monocytogenes* on RTE salads. Variations in average temperature followed a normal distribution $N(6.62, 2.56)$, while the variability of temperature variance was described by a Gamma distribution $G(2.00, 1.00)$. As expected, when the *Time of day-Temperature* profile was plotted over a 24 h period, changes corresponding to the transition between “day” and “night” were observed. Knowledge of consumption patterns and consumer hygiene practices is essential, first in assessing the risk of listeriosis (risk assessment), and second in taking measures to manage that risk (risk management).

Keywords: Consumption pattern; Temperature; *Listeria monocytogenes*; Fresh-cut leafy green salads; Risk.

1. INTRODUCTION

Fresh-cut or ready-to-eat (RTE) fruits and vegetables were developed to meet the consumer need for “quick”, convenient products, and to take advantage of the healthy image enjoyed by fruits and vegetables (2). Most research on these foods has hitherto focused on their microbiological quality, safety, processing and packaging (9, 13, 14, 20, 32, 34). More recently, Ragaert et al. (24) reported on preferences and consumer perception of minimally-processed vegetables and fruits, though they gathered no information regarding consumer hygiene practices.

The microbial ecology of *Listeria monocytogenes* has been identified as a major safety concern for fresh-cut food produce (12); this specie is a human pathogen that may be associated with fresh produce, since it is ubiquitous in agricultural/farm environments. It has been isolated from a wide range of both intact (6, 19, 21, 30) and fresh-cut vegetables (10, 11, 18, 19, 23, 27, 28). Being psychrotrophic, this pathogen can proliferate at refrigeration temperatures at which fresh-cut produce is typically stored. Nonetheless, exposure to *L. monocytogenes* in a given population depends not only on *Listeria* cell levels at the time of consumption (individual exposure) through a particular food, but also on consumption patterns. All this information must be collated to carry out an exposure assessment, a crucial stage within risk assessment.

Part 3 of FAO's 2004 risk assessment (7) of *L. monocytogenes* in RTE foods lists the type of data typically required to perform an assessment of foodborne exposure to *L. monocytogenes*; five general groups are identified, one being: “data which describe the amount of the product eaten at each meal or serving and the frequency of eating, and, if possible, the consumption characteristics of sub-groups of the population that are particularly susceptible to listeriosis”. Some data sources addressing the consumption of RTE foods are not always available, or do not have the level of detail required to identify a specific RTE food, tending to be grouped into broader categories based on nutritional composition, but which may not be related to the risk of listeriosis (7). Such sources include national or regional nutrition surveys mandated by governments, and the inventory databases of food retailers, the latter providing estimates of their market share and “wastage” (i.e. product not sold but discarded because of spoilage, damage or other loss), and, from this information, estimates of specific consumption levels from national to

local levels can be derived; however, commercial confidentiality and consumer privacy are issues that often hinder access to these data.

Risk assessment, risk management and risk communication are the three elements of risk analysis, defined as the basis of food law in the European Union, in order to achieve the general objective of a high level of protection (*Article 6.1* of Regulation (EC) N° 178/2002). In addition, for risk management purposes, it is crucial to learn from population behavior, as only rational, sensible and feasible actions should be undertaken in order to reduce microbiological risks.

No data are yet available regarding consumption patterns for fresh-cut leafy green salads and refrigerator temperatures in Spain. Consumption pattern data are necessary when attempting to assess the risks posed by RTE foods contaminated with foodborne pathogens. A number of studies have addressed domestic refrigerator temperatures elsewhere, though not in Spain.

This paper reports on a survey designed to collect information regarding consumption patterns of fresh-cut leafy green salads and temperatures of domestic refrigerators, which could be readily used in risk assessments.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Survey

The first part of the survey consisted of face-to-face interviews ($n = 107$) carried out in Córdoba (Spain). Survey participants were selected at random in the street. The questionnaire is shown in Figure 1. Some questions addressed the purchase of fresh-cut leafy green salads, their advantages and the reasons for not buying them, while others were targeted at food safety with these responses providing information that could be used in a risk assessment of a particular health hazard carried by fresh-cut leafy green salads.

In the second part of the survey, domestic refrigerator temperatures ($n = 30$) were recorded using a Tinytag Ultra 2 data logger (Gemini Data Loggers (UK) Ltd, Chichester, UK), which was set to measure the temperature every 30 seconds over 24 hours (for every refrigerator, $n_i = 2880$ temperature data points were obtained). The data logger started temperature measurements at the same time in every refrigerator. When recording finished, the data logger

was collected and information was downloaded using Tinytag Explorer software 4.2 (Gemini Data Loggers (UK) Ltd, Chichester, UK).

Do you do the shopping?: Yes No Sometimes
 Age: ____
 Male Female
 Family size: ____

1. Are you familiar with fresh-cut leafy green salads?

Yes No

2. What do you see as the advantages of fresh-cut leafy green salads?

- Time-saving
- Convenient
- Ingredients more appetizing (due to flavour and/or texture) than those of the salads I make
- They contain ingredients I do not usually find at the market (e.g. a wide variety of lettuces)
- Other advantages
- None

3. Have you ever bought fresh-cut leafy green salads?

Yes No

5. How do you often eat these salads?

- Occasionally
- Once or twice a month
- Once or twice a week
- More than twice a week

4. Why not?

- Although I'm familiar with these salads, I prefer to make my own
- They are expensive
- I don't feel these salads are safe to eat
- The shelf-life of these salads is very short
- They don't contain the ingredients I like
- Other reasons

6. Do you respect the "use by" date of fresh-cut leafy green salads?
 Yes No Not always

7. What kind of fresh-cut leafy green salad do you usually buy?

- Fresh-cut lettuce
- Fresh-cut mixed salads (lettuce and other ingredients)
- Others

8. Comments:

Figure 1. Questionnaire: Consumption and safety of fresh-cut leafy green salads.

2.2. Data analysis

Results from the first part of the survey (questionnaires) were entered in SPSS for Windows 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) for analysis. The Kruskal-Wallis non-parametric test was performed to investigate possible significant differences between consumption frequencies in three age groups (under 25, 26-40, 41 plus).

Data from the second part of the survey (temperature of domestic refrigerators) were exported to an Excel spreadsheet. In order to provide as much information as possible, temperature data were computed in different ways.

Variability distributions for average temperature and temperature variance were constructed using the mathematical basis stated by Afchain et al. (1). Denoting $\theta_{i(k)}$ every recorded temperature of the domestic refrigerator i , with $i=1, \dots, n$, and $k=1, \dots, n_i$, we considered a sample constituted by n_i temperatures $\theta_{i(1)}, \theta_{i(2)}, \dots, \theta_{i(k)}$, for the domestic refrigerator i . When applying the Central Limit Theorem to a sample, it was assumed that the random variables $\theta_{i(1)}, \theta_{i(2)}, \dots, \theta_{i(k)}$ were independent and identically distributed. The variable “average temperature” of each refrigerator was then computed for sample size n_i , which followed the Normal distribution $N(m_i, \sigma_i^2)$; parameters were estimated as follows:

$$\begin{cases} \hat{m}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{k=1}^{n_i} \theta_{ik} \\ \hat{\sigma}_i^2 = \frac{1}{n_i} \sum_{k=1}^{n_i} (\theta_{ik} - \hat{m}_i)^2 \end{cases}$$

Using all these average temperatures, a variability distribution was determined for \hat{m}_i . Thus, \hat{m}_i followed the Normal distribution $N(m, \sigma^2)$, parameters being estimated as follows:

$$\begin{cases} \hat{m} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \hat{m}_i \\ \hat{\sigma}^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\hat{m}_i - \hat{m})^2 \end{cases}$$

The Gamma distribution was selected to describe the variability of $\hat{\sigma}_i^2$.

Additionally, the *Time of day-Temperature* profile was plotted in order to study changes over a 24 h period. For this purpose, data points (1 data

point = a pair $time_{(k)} - \theta_{(k)}$) from all refrigerators were pooled and entered on an Excel spreadsheet. Mean temperatures (μ), standard deviations of temperatures (σ) and the percentages of domestic refrigerators displaying temperatures above 10°C ($\% > 10^\circ\text{C}$) were plotted against time. Moreover, two time intervals were defined on the basis of high and low temperatures (corresponding approximately to “day” and “night” time) and temperature data points lying within each interval were selected to fit Normal distributions using Palisade @Risk Professional® software.

Finally, to allow comparison with other temperature reports, the temperature data tabulated in the works of Notermans et al. (22) (N), Johnson et al. (15) (J), Audits International (4) (AI) and Azevedo et al. (5) (A) were entered on an Excel spreadsheet, and cumulative distributions were constructed so that mean, standard deviation and 90% percentile could be calculated with Palisade @Risk Professional® software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Consumption patterns

Demographic data for the survey were as follows (mean \pm SD): respondent age 30.6 ± 11.3 , family size 3.37 ± 1.5 ; 29.9% of respondents were male; there was no significant difference in the mean age of male and female respondents ($P = 0.820$).

All respondents were familiar with fresh-cut leafy green salads. The most widely reported advantages were “saving time” and “convenience”. Ragaert et al. (24) also found that “speed” and “convenience” were the major reasons for buying minimally- processed vegetables.

Most respondents (75.7%) had bought fresh-cut leafy green salads at some time. Only 7.41% of these consumed fresh-cut leafy green salads *more than twice a week*, 17.28% *once or twice a week*, 29.63% *once or twice a month* and 45.68% *occasionally*. The Kruskal-Wallis test showed no significant differences between consumption frequencies for the three age groups ($P = 0.146$). Ragaert et al. (24) reported higher consumption frequencies than those found here. This may be due to differences in the volume of these products sold/ marketed in Belgium and Spain: in Belgium, more than 50% of retail sales of fruits and vegetables consist of minimally-processed products (24), compared with only 4% in Spain (17). In Spain,

annual consumption of minimally-processed produce was 1.5-2 kg per capita in 2005, compared with 6 kg per capita in France and 30 kg per capita in the United States (17). The consumption frequencies reported by Ragaert et al. (24) were distributed as follows: 57.1% purchased (minimally-processed vegetables or packaged fruits) once a week, 35.4% once a month, and only 7.5% less than once a month. In the present study, 80.8% of those respondents who had never bought fresh-cut leafy green salads (24.3%) indicated that they preferred to make the salads themselves; this was their main reason for not purchasing fresh-cut leafy green salads, followed by high price (26.9%).

Within the group of consumers who had bought fresh-cut leafy green salads at some time, the most popular product was fresh-cut mixed salad (90.1% of respondents), while purchases of fresh-cut lettuce were considerably smaller (9.9% of respondents); an even lower percentage of respondents (8.6%) had bought other types of vegetables. Ragaert et al. (24) reported that, among minimally-processed vegetables and packaged fruits, mixed shredded lettuce variants were the most popular products.

A total of 9.9% of consumers, mostly in the 20-35 age group, admitted not always respecting the “use by” date stated on the label of fresh-cut leafy green salads. Food safety concerns have led to expiration dating on food which differs from freshness dating (i.e. “best if used by” dating), with the latter appearing as an implicit guarantee of food quality (31). Expiration or “use-by” dates should be safety-based (safety-based “use-by” date label; SBDL). Recently, the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (25) (U.S. Department of Agriculture) was asked to provide advice on the requisite scientific parameters for establishing SBDLs for refrigerated RTE foods, in order to help reduce the incidence of foodborne illness. The Committee determined that *L. monocytogenes* is the appropriate target organism for refrigerated RTE foods that support its growth, and consequently, assessing the behaviour of this pathogen on these foods should be the basis for establishing a SBDL. Bearing this in mind, if the worldwide production of fresh-cut leafy green salads had a SBDL as indicated above, those consumers who admitted they did not always respect the “use-by” date (9.9%) would potentially be at risk.

The last point on the questionnaire (“Comments”) was optional and open-ended. Among respondents who had consumed fresh-cut leafy green salads at some time, 11.1% stated that they found these salads less fresh than salads

prepared themselves from raw ingredients. However, some of these – and many other respondents – insisted that their main reasons for purchasing fresh-cut leafy green salads were speed and convenience.

3.2. Temperature of domestic refrigerators

The variability in average refrigerator temperature was described by a Normal distribution $N(6.62, 2.56)$, while a Gamma distribution $G(2.00, 1.00)$ accounted for the variability of temperature variance.

The *Time of day-Temperature* profile over a 24 h period is shown in Figure 2.

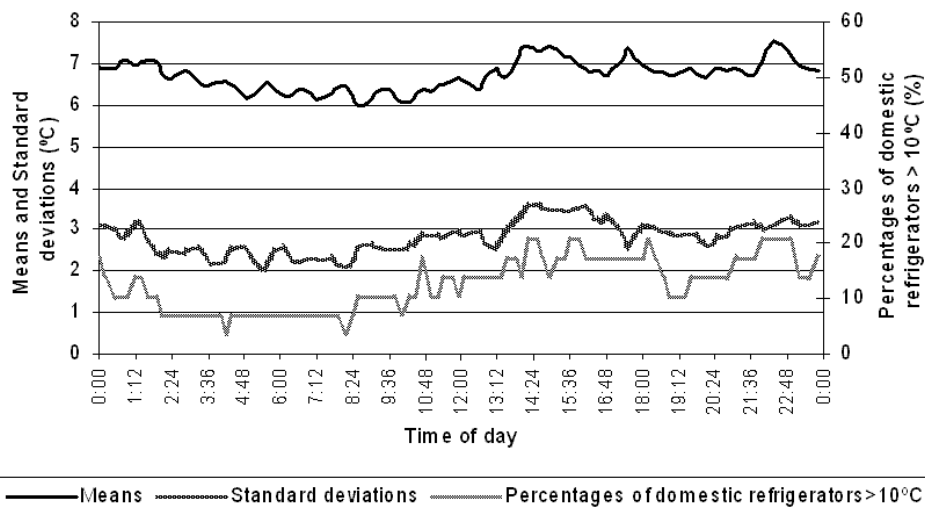


Figure 2. *Time of day-Temperature* profile over a 24 h period.

Mean temperatures (μ), standard deviations (σ) and percentages of domestic refrigerators exhibiting temperatures above 10°C ($\% > 10^{\circ}\text{C}$) were plotted against time. Strikingly, all three lines displayed the same trends for the different periods: at the start, values for μ , σ and $\% > 10^{\circ}\text{C}$ were relatively high, while by $\approx 1:30$ h, they had declined to a level which was thereafter maintained for ≈ 7 hours, i.e. from $\approx 4:30$ h to $\approx 11:30$ h (“night” time). Thenceforth, temperatures gradually increased to relatively high levels, at which they remained until the end of the day; some peaks were observed in μ values during this high temperature period, in the ranges $\approx 13:00$ h to $\approx 16:00$ h, and $\approx 21:00$ h to $\approx 23:48$ h, corresponding to the usual lunch and dinner time in Spain. There was a notable difference in μ , σ and $\% > 10^{\circ}\text{C}$ between

“day” and “night”. Figures 3a and 3b show the Normal temperature distributions associated with “day” and “night” time, respectively; means and variance of both distributions were statistically different ($P = 0.000$ in both cases).

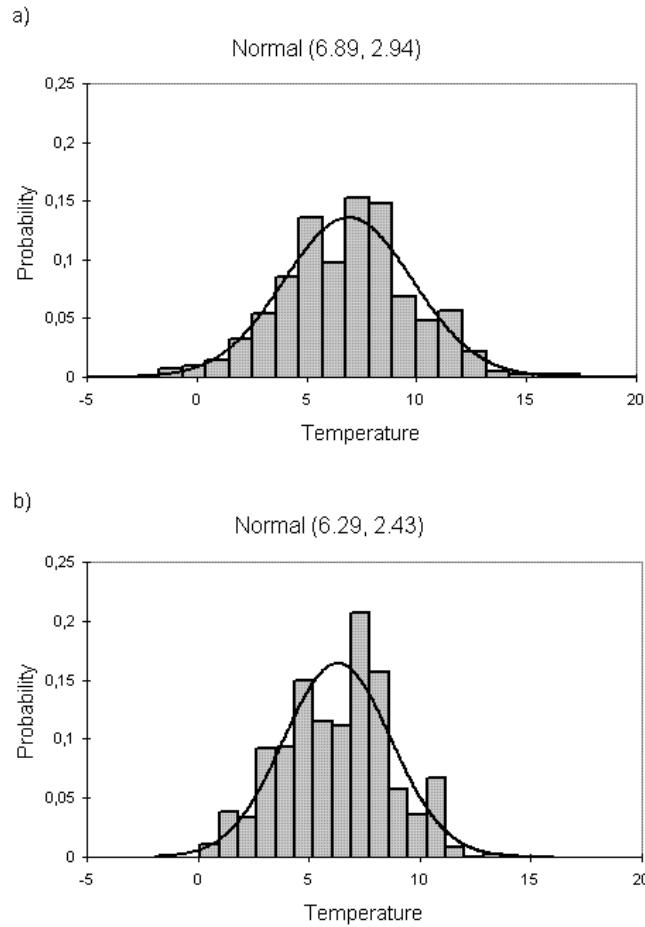


Figure 3. Normal temperature distributions for: a) “day” time and b) “night” time.

Other papers report a range of findings for domestic refrigerator temperatures. Johnson et al. (15), in a survey of food safety knowledge and practices among elderly people living at home, investigated 645 refrigerators; 70% of them were too warm for the safe storage of food ($\geq 6^{\circ}\text{C}$). They stated that the storage of foods at inappropriate temperatures was not independent of socioeconomic or demographic status, and tended to be more likely among the poorer and those not living alone. Sergelidis et al. (26) studied the temperature of domestic, retail and industrial refrigerators in Greece,

reporting that 55% of 136 domestic, and 32% of 228 retail store refrigerators, displayed temperatures $> 9^{\circ}\text{C}$; 25% and 13.6%, respectively, exceeded 10°C . Willcox et al. (33) found that in 50% of the household refrigerators examined, the average temperature exceeded 10°C , and claimed that these temperatures easily permit the growth of not only *L. monocytogenes* but also a large number of other pathogenic and spoilage organisms.

Table 1 shows some statistical measures of temperature data reported by other authors (N, J, AI and A) and those recorded in the present study (C). The temperature recorded in the USA (AI) was the lowest (lowest mean and 90% percentile), followed by temperatures in northern countries (UK and The Netherlands, J and N respectively), and finally, temperatures recorded in Mediterranean countries (Portugal and Spain, A and C, respectively). This suggests that geographical differences may influence the temperature of domestic refrigerators. From a safety perspective, those foods that support the growth of potential pathogens and are intended to be stored in domestic refrigerators, pose higher risk in Mediterranean countries than in northern countries or the USA when they are contaminated.

Table 1. Some statistical measures of temperature data reported by the works of Notermans et al. (22) (N), Johnson et al. (15) (J), Audits International (4) (AI) and Azevedo et al. (5) (A), and those found in the present study (C).

	N	J	AI	A	C
Mean	5.65	5.75	4.12	7.22	6.60
^a SD	2.48	2.09	2.32	2.54	2.47
^b 90% perc.	8.47	7.89	6.69	10.42	10.00

^aStandard deviation.

^b90% percentile.

3.3. Approach to evaluating the risk of listeriosis fro consuming fresh-cut leafy green salads

Knowledge of consumption patterns and consumer hygiene practices is essential, first in assessing the risk of listeriosis (risk assessment), and second in taking measures to manage that risk (risk management). The results obtained here suggest that, for risk assessment purposes, it may be assumed that:

- ✓ The distribution of consumption frequencies - 7.41% *more than twice a week*, 17.28% *once or twice a week*, 29.63% *once or twice a month* and 45.68% *occasionally*, could be applied to the entire

population as an approximation; no significant differences were found between the three age-groups considered. Further data collection would enable more detailed age groups to be considered, thus achieving a more refined statistical test.

- ✓ If SBDLs, as described above, are to be widely adopted, then 9.9% of the population could be potentially exposed to dangerous levels of *L. monocytogenes* at the consumption frequencies reported above.
- ✓ Temperatures found in domestic refrigerators are compatible with the growth of *L. monocytogenes* on fresh-cut leafy green salads (8, 16, 27, 29). Two stochastic presentations of temperatures in domestic refrigerators are provided.

It is worth emphasizing the importance of collecting valuable data for risk assessment and management (3). Risk assessments for a given population are often based on input values that do not correspond to the population in question, yet they are still accepted due to the lack of available data. However, it is always best to use data from the population being studied.

This study sought to identify consumption patterns of fresh-cut leafy green salads and determine the temperature of domestic refrigerators in Córdoba (Spain), as an approximation. Nevertheless, competent authorities should clearly undertake more comprehensive surveys to obtain valuable representative information regarding food safety, since the health authorities are, in the last analysis, risk managers.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Junta de Andalucía, projects CAL-01-032 and AGL 2005-119, and by European ERDF funding. The authors would like to thank everyone who contributed to this study, and especially, Mrs. Josefa Jiménez for her assistance.

REFERENCES

1. Afchain, A. L., E. Derens, J. Guilpart, and M. Cornu. 2005. Statistical modelling of cold-smoked salmon temperature profiles for risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *Acta Hort. (ISHS)* 674:383-388.

2. Ahvenainen, R. 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Tech.* 7:179-187.
3. Anonymous. 2004. COST 920 on Foodborne Zoonoses, Working group 3 Quantitative Risk Assessment. Proceedings of the Workshop on data needs in risk assessment, Pamplona, Spain, 28-30 June 2004. Available at: <http://www.cost920.com/PamplonaProceedings.pdf>. Accessed 1 July 2006.
4. Audits International, and Food and Drug Administration. 2000. 1999 U.S. Food Temperature Evaluation. Available at: http://www.foodrisk.org/audits_international.htm. Accessed 1 September 2006.
5. Azevedo, I., M. Regalo, C. Mena, G. Almeida, L. Carneiro, P. Teixeira, T. Hogg, and P. A. Gibbs. 2005. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control* 16:121-124.
6. De Simón, M., C. Tarragó, and M. D. Ferrer. 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 16:153-156.
7. FAO. 2004. Risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Available at: http://www.fao.org/ag/agn/jemra/listeria_en.stm. Accessed 5 June 2006.
8. Francis, G. A., and D. O'Beirne. 1997. Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. *Int. J. Food Sci. Technol.* 32:141-151.
9. Francis, G. A., C. Thomas, and D. O'Beirne. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34:1-22.
10. García-Gimeno, R. M., G. Zurera-Cosano, and M. Amaro-López. 1996. Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetable salads in Spain. *J. Food Safety* 16:75-86.
11. Gombas, D. E., Y. H. Chen, R. S. Clavero, and V. N. Scott. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J. Food Prot.* 66:559-569.
12. Gorny, J. R. 2003. Innovative fresh-cut technologies and business/marketing strategies, p. 14-22. In Colelli, G. and Amodio, M. L. (ed.), *Improving quality management in the minimally-processed fruit and vegetables industry of the Euro-Med area*. Proceedings of the Workshop, Mesagne (BR), Italy, 13-14

December 2003. Università degli Studi di Foggia - Facoltà di Agraria, Foggia, Italy.

13. Jacxsens, L., F. Devlieghere, and J. Debevere. 2002. Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. *Postharvest Biol. Technol.* 26:59-73.
14. Jacxsens, L., F. Devlieghere, P. Ragaert, E. Vanneste, and J. Debevere. 2003. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.* 83:263-280.
15. Johnson, A. E., A. J. Donkin, K. Morgan, J. M. Lilley, R. J. Neale, R. M. Page, and R. Silbum. 1998. Food safety knowledge and practice among elderly people living at home. *J. Epidemiol. Commun. H.* 52:745-748.
16. Koseki, S., and S. Isobe. 2005. Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. *Int. J. Food Microbiol.* 101:217-225.
17. Lobo, G., and M. González. 2006. Estado actual de los productos mínimamente procesados en España. IV Encontro Nacional sobre processamento mínimo de frutas e hortaliças y I Simposio Ibero-americano de vegetais frescos cortados, Sao Pedro, SP, Brasil, 4-7 April 2006. Available at: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lpv/eventos/palestras/Gloria.pdf>. Accessed 3 July 2006.
18. MacGowan, A. P., K. Bowker, J. McLauchlin, P. M. Bennett, and D. S. Reeves. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.* 21:325-334.
19. McLauchlin, J., and R. J. Gilbert. 1990. *Listeria* in food. *PHLS Microbiol. Digest.* 7:54-55.
20. Nguyen-The, C., and F. Carlin. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34:371-401.
21. Nørrung, B., J. K. Andersen, and J. Schlundt. 1999. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* 53:195-203.

22. Notermans, S., J. Dufrenne, P. Teunis, R. Beumer, M. T. Giffel, and P. P. Weem. 1997. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.* 14:143-151.
23. Petran, R. L., E. A. Zottola, and R. B. Gravani. 1988. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. *J. Food Sci.* 53:1238-1240.
24. Ragaert, P., W. Verbeke, F. Devlieghere, and J. Debevere. 2004. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Qual. Prefer.* 15:259-270.
25. Ransom, G. 2005. Considerations for establishing safety-based consume-by date labels for refrigerated ready-to-eat foods. *J. Food Prot.* 68:1761-1775.
26. Sergelidis, D., A. Abraham, A. Sarimvei, C. Panoulis, P. Karaioannoglou, and 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.
27. Steinbruegge, E. G., R. B. Maxcy, and M. B. Liewen. 1988. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. *J. Food Prot.* 51:596-599.
28. Szabo, E. A., K. J. Scurrah, and J. M. Burrows. 2000. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:456-460.
29. Szabo, E. A., L. Simons, M. J. Coventry, and M. B. Cole. 2003. Assessment of control measures to achieve a food safety objective of less than 100 CFU of *Listeria monocytogenes* per gram at the point of consumption for fresh precut iceberg lettuce. *J. Food Prot.* 66:256-264.
30. Vitas, A. I., V. Aguado, and I. Garcia-Jalon. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 90:349-356.
31. Wansink, B., and A. O. Wright. 2006. "Best if used by..." How freshness dating influences food acceptance. *J. Food Sci.* 71:S354-S357.
32. Wiley, R. C. (ed.). 1994. *Minimally Processed Refrigerated Fruits & Vegetables*. Chapman & Hall, New York, USA.

33. Willocx, F., M. Hendrickx, and P. Tobback. 1993. Temperatures in the distribution chain. Proceedings of the First European "Sous vide" cooking symposium, Leuven, Belgium, 25-26 March 2003.
34. Zagory, D. 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biol. Tec.* 15:313-321.

CAPÍTULO 7. ANÁLISIS DEL RIESGO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ENSALADAS DE IV GAMA

RESUMEN

El Análisis de Riesgos se enmarca como la base de la legislación alimentaria en Europa, como se expuso en el capítulo 1. Se compone de tres elementos interrelacionados: Evaluación, Gestión y Comunicación del Riesgo. En la actualidad, aún no se han implantado en España la Evaluación y Gestión del Riesgo en la forma recomendada por el Codex Alimentarius y la FAO/WHO, respectivamente. En el presente capítulo se abordan la Evaluación (ER) y Gestión del Riesgo de listeriosis por consumo de ensaladas de IV gama. En el capítulo 2 se describió el agente etiológico, *Listeria monocytogenes*, así como la listeriosis. En el capítulo 3 se mostró que los vegetales son susceptibles de ser contaminados por *L. monocytogenes*, y que su tratamiento industrial no garantizaba la ausencia del patógeno. El trabajo expuesto en el capítulo 5 demostró que el microorganismo es capaz de crecer en la ensalada de lechuga de IV gama, alcanzando altos niveles tras el almacenamiento en refrigeración.

Por todo esto, en el presente capítulo se lleva a cabo una ER de listeriosis que presenta el consumo de ensaladas de lechuga de IV gama siguiendo las pautas del Codex Alimentarius, y se propusieron varias medidas de gestión para disminuir el riesgo. Los resultados presentados en el capítulo 6 se emplearon para dicha evaluación. La ER fue de tipo cuantitativo y estocástico, por lo que las variables consideradas en el modelo de ER se describieron mediante distribuciones de probabilidad, entendida esta como incertidumbre en algunos casos, y variabilidad en otros. La ER se compone de cuatro fases: identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo. La evaluación de la exposición consistió la parte más compleja, pues se modelaron la concentración y prevalencia de *L. monocytogenes* a lo largo de la cadena “de la huerta a la mesa”. Se escogió el modelo dosis-respuesta Weibull-Gamma para caracterizar *L. monocytogenes*. Con las distribuciones de probabilidad y el modelo dosis-respuesta empleados, se calculó el número de casos al año en la población de bajo y alto riesgo para varios escenarios de prevalencia inicial del patógeno en lechuga (incertidumbre del modelo de ER). Así, el número de casos varió entre 2×10^1 - 9×10^2 y 6×10^4 - 3×10^6 para la población de bajo y alto riesgo, respectivamente. La mediana de cada rango disminuyó hasta valores

de 4×10^{-2} y 2×10^2 para las respectivas poblaciones, suponiendo el cumplimiento del criterio microbiológico ≤ 100 ufc/g a lo largo de la vida comercial del producto (Reglamento (CE) N° 2073/2005). Entre los inputs considerados en el análisis de sensibilidad, el *tamaño de ración* fue aquel para el que el output *número de casos de listeriosis* se mostró más sensible en ambos tipos de población. En orden decreciente de sensibilidad, le siguieron los inputs *temperatura de almacenamiento doméstico*, *tiempo de almacenamiento doméstico* y *nivel de L. monocytogenes en el momento de consumo*. De las cuatro medidas de gestión analizadas, la inyección de gases durante el empaquetado de las ensaladas ($\text{CO}_2 \approx 5.5\%$, $\text{O}_2 \approx 3\%$ y balance de N_2) fue la más efectiva para la reducción del número de casos, seguido por un *almacenamiento doméstico en refrigeración = 4 días*, y una *disminución del consumo de ensaladas de IV gama por parte de la población de alto riesgo* (disminución del 50% de la probabilidad de consumo). Tanto las enfermedades alimentarias como las medidas de gestión para reducir la carga de enfermedad conllevan un gasto económico. Es la autoridad competente la que debe sopesarlos y tomar decisiones al respecto.

La siguiente publicación recoge el trabajo presentado:

Risk assessment and management of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salads

E. Carrasco*, F. Pérez-Rodríguez, A. Valero, R. M. García-Gimeno and G. Zurera

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba,
Campus de Rabanales, Edificio Darwin – Anexo. C.P. 14014, Córdoba, España.

Enviado al International Journal of Food Microbiology

RISK ASSESSMENT AND MANAGEMENT OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN READY-TO-EAT SALADS

ABSTRACT

Diseases caused by foodborne pathogens constitute a world wide public health problem and preventing them is a major goal of societies. The basis to decide the degree of protection in a country and provide scientific evidence, resides in Risk Analysis. Risk Analysis is a compendium of three elements: Risk Assessment (RA), Risk Management (RM) and Risk Communication. RA is now well recognized as a RM decision-support tool, enabling the comparison of RM options and control measures. The risk posed by different foodborne pathogens is often asked by risk managers to be assessed (RA) with different purposes. Listeriosis is a foodborne disease that, despite infrequent, is subject of concern among manufacturers and Sanitary Authorities due to its high mortality rate and wide spread of the pathogen in foods and the environment. Consequently, it is desirable and useful to know the risk posed by *Listeria monocytogenes*, the main factors influencing the risk and the effect that RM measures could take on the risk. This work presents a probabilistic Quantitative Microbiological RA (QMRA) of *L. monocytogenes* in RTE lettuce salads in Spain, a sensitivity analysis to highlight the main inputs implicated and an approach to implement RM measures. The guideline provided by Codex Alimentarius was followed to carry out the QMRA. By means of probability distributions for different inputs and the Weibull-Gamma dose-response model, Monte Carlo simulations were run for the number of cases in low- and high-risk population. With the assumptions made and data modelling, the final number of cases per year ranged between 2×10^1 - 9×10^2 and 6×10^4 - 3×10^6 for low- and high-risk population, respectively. The median value of each range would decrease until 4×10^{-2} and 2×10^2 for the respective populations if the criterion ≤ 100 cfu/g throughout the shelf-life of the product was fulfilled. The input to which the model outputs (number of cases in low and high-risk population) were most sensitive was serving size, followed by the temperature during storage at home, time of storage at home and level of *L. monocytogenes* at the time of consumption. From the four RM measures implemented, the injection of a mixture of gases in packages at manufacture ($\text{CO}_2 \approx 5.5\%$, $\text{O}_2 \approx 3\%$ and N_2 balance) was the most effective in reducing the number of cases, followed by

4-days storage time at home and prevention of high-risk consumers from consumption of RTE salads. Both foodborne illnesses and the implementation of RM measures bring costs; it is a matter of the competent authorities to balance them and make decisions.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; ready-to-eat lettuce salads; sensitivity analysis; consumption.

1. NOMENCLATURE

Cons: Number of consumers of RTE salads in Spain with a consumption profile i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ servings per year).

1g, 2g, 3g-L_{pack}: Number of 1g, 2g and 3g-contaminated pieces of lettuce, respectively, in a package.

Grams 1g, 2g, 3g-L_L: Grams of contaminated pieces of lettuce of 1g, 2g and 3g, respectively, in a lot after washing.

N_{pack}: Concentration of *Listeria monocytogenes* in packages of RTE salad after shredding at the factory (\log_{10} cfu/package).

N_{pack-cons}: Concentration of *L. monocytogenes* in packages of RTE salad at the time of consumption (\log_{10} cfu/package).

N_{r-25g}: Concentration of *L. monocytogenes* in raw produce (\log_{10} cfu/25g).

N_{w-25g} and N_{w-g}: Concentration of *L. monocytogenes* in washed produce (\log_{10} cfu/25g and \log_{10} cfu/g, respectively).

P: Probability.

P_c: Percentage of population that consumes RTE salads lettuce-based.

PI: Probability of illness per contaminated serving.

PI_{approx}: Normal approximation to PI.

Pop: Spanish population size (either low or high-risk).

Prevo: Prevalence of contaminated heads of lettuce (unit fraction).

Prev_{pack}: Prevalence of contaminated packages (unit fraction).

Prev-M_{n10}: Prevalence defined by various sources whose 95% confidences are equal or greater than the 95% confidence of UPrev_{n10} for the same value.

Prev-M_{n20}: Prevalence defined by various sources whose 95% confidences are equal or greater than the 95% confidence of UPrev_{n20} for the same value.

Prev-M_{n30}: Prevalence defined by various sources whose 95% confidences are equal or greater than the 95% confidence of UPrev_{n30} for the same value.

R: Decimal log reduction of the concentration of *L. monocytogenes* on produce by washing with chlorine (\log_{10} cfu/25g).

S_i: Number of servings consumed per individual and year ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$).

S_{cont; i}: Number of contaminated servings consumed per individual and year with a consumption profile i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ servings per year).

S1, S2, S3 and S4: Number of servings consumed per individual and year at one of the following frequencies: *occasionally* (S1), *once or twice a month* (S2), *once or twice a week* (S3) or *more than twice a week* (S4).

S_{cont-Pop; i}: Number of contaminated servings consumed by the Spanish population in a year with a consumption profile i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ servings per year).

$S_{\text{cont-Pop}}$: Number of contaminated servings consumed by the Spanish population in a year

SS: Serving size (g).

Temp_H = Storage temperature in domestic refrigerators ($^{\circ}\text{C}$)

Time_H = Storage time in domestic refrigerators (h)

Temp_R = Storage temperature at retail/foodservice ($^{\circ}\text{C}$)

time_R = Storage time at retail/foodservice (h)

Temp_T = Mean change in temperature during transportation from store to home ($^{\circ}\text{C}$)

time_T = Transportation time from store to home (h)

UPrev_{n10} : Uncertainty of the prevalence of a lot which fulfils a microbiological criterion $n=10$ $c=0$, absence in 25 g.

UPrev_{n20} : Uncertainty of the prevalence of a lot which fulfils a microbiological criterion $n=20$ $c=0$, absence in 25 g.

UPrev_{n30} : Uncertainty of the prevalence of a lot which fulfils a microbiological criterion $n=30$ $c=0$, absence in 25 g.

$\text{UPrev}_{\text{source}}$: Uncertainty of the prevalence found by the corresponding source reference in Table A6.

W-G model: Weibull-Gamma model.

X_{pack} : Number of contaminated grams of product in a package.

X_{r-L} : Number of contaminated grams of raw product in a lot.

X_{w-L} : Number of contaminated grams of washed product in a lot.

2. INTRODUCTION

Diseases caused by foodborne pathogens constitute a world wide public health problem and preventing them is a major goal of societies. All countries aim at reducing foodborne illness. Countries have traditionally attempted to improve food safety by setting microbiological criteria for raw or for finished processed products. However, the frequency and extent of sampling used in traditional food testing programs may not provide an adequate degree of consumer protection. In most cases, a microbiological criterion has been set without estimating its effect on reducing the risk foodborne disease. Sometimes microbiological criteria established by national governments for different foods have been viewed by other countries as barriers to international trade, if a stricter level is imposed than the international level for foods in trade. Addressing this issue, more than 100 countries have signed the “Sanitary and Phytosanitary (SPS) Agreement” of the World Trade Organization (WTO), that states that “whilst a country has the sovereign right to decide on the degree of protection it wishes for its citizens, it must provide, if required, the scientific evidence on which this level of protection rests”. It follows that if a country sets a microbiological criterion –or any other limit – for a particular health hazard in a particular food product, they must be able to explain, based on scientific data, consideration of risk and societal considerations, the rationale and justification for the criterion. Another WTO agreement, the “Technical Barriers to Trade (TBT) Agreement”, also requires that a country must not ask for higher degree of safety for imported goods than it does for foods produced in its own country.

The basis to decide the degree of protection in a country and provide scientific evidence, resides in Risk Analysis. Risk Analysis is a compendium of three elements: Risk Assessment, Risk Management and Risk Communication, all of them interrelated (Codex Alimentarius, 1999).

Risk Assessment (RA) is a scientifically based process consisting of the following steps: (i) hazard identification, (ii) hazard characterization, (iii) exposure assessment, and (iv) risk characterization. The result of a RA is an estimate (quantitative or qualitative) of the probability of occurrence of known or potential adverse health effects in a given population. If it is decided to develop a quantitative RA, a choice between deterministic or probabilistic approach should be made. The type of RA to be used is dependent upon the availability of relevant data and the type of questions posed by the risk manager. The advantage of the probabilistic approach is

that it provides more information about the effect of the variability and uncertainty of the RA inputs on the risk estimate.

Risk Management (RM) is the process of weighing policy alternatives in the light of the results of RA and, if required, selecting and implementing appropriate control measures. *Control* means prevention, elimination, or reduction of hazards and/or minimization of risks.

RA is now well recognized as a RM decision-support tool, enabling the comparison of RM options and control measures. RA, in principle, provides information regarding sanitary aspects of the impact of a potential contaminated food in a population. However, other issues, such as economic impact, could be also considered in the design of a RA. It is important to bear in mind that risk managers will always need to balance costs with the reduction in foodborne illnesses.

The degree of protection mentioned above (SPS agreement) is known as the Appropriate Level of Protection (ALOP). The SPS agreement defined ALOP as “*the level of protection deemed appropriate by the Member establishing a sanitary or phytosanitary measure to protect human, animal or plant life or health within its territory*”. An ALOP is an expression of the level of protection at the current time, i.e. due to considerations like improvements in safety control measures (e.g. new process technologies), ALOPs may be revised over time and modified if considered appropriate. Another concept closely related to ALOP is the Food Safety Objective (FSO), defined by ICMSF (2002) as “*the maximum frequency and/or concentration of a microbiological hazard in a food at the time of consumption that provides the appropriate level of health protection*”.

All these concepts regarding Risk Analysis are being gradually adopted, and not all countries have applied a formal Risk Analysis so far. Microbial pathogens such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* or *Listeria monocytogenes* transmitted by a variety of food commodities, have been submitted to RA by different organizations and countries (http://www.foodrisk.org/risk_assessments.cfm; <http://www.cost920.com/00020.html>). Also, RM reports have been published worldwide (http://www.foodrisk.org/about_RM_bio.cfm).

The interest for assessing the risk of *L. monocytogenes* via food has its origin in two principal features: i) the high mortality rate of the disease (20-40%) (McLauchlin, 1993; Rocourt, 1994), and ii) the wide spread of the pathogen in foods and the environment.

L. monocytogenes has been implicated in a large well-documented foodborne outbreaks and sporadic cases in RTE foods (Schlech et al, 1983; Ho, Shands, Friedland, Eckind & Fraser, 1986; Bille, 1990; McLauchlin, Hall, Velani & Gilbert, 1991; Goulet et al, 1995; Lyytikäinen et al, 1999; Aureli et al, 2000). Consistently, the microorganism has been isolated from a wide range of raw and RTE meats, poultry, dairy products and vegetables as well as from various foods processing environments (Genigeorgis, Oanca & Dutulescu, 1990; Jeong & Frank, 1994; Arnold & Coble, 1995; De Simón & Ferrer, 1998; Nørrung, Andersen & Schlundt, 1999; Guerra, McLauchlin & Bernardo, 2001; Miettinen, Palmu, Bjorkroth & Korkeala, 2001; Gombas, Chen, Clavero & Scott, 2003; Vitas, Aguado & Garcia-Jalon, 2004; Flores et al, 2004; Gudbjornsdottir et al, 2004; Thevenot, ignette-Muller, Christieans & Vernozy-Rozand, 2005). The ubiquitous nature and great persistence of the pathogen in different environments make very difficult its eradication.

RTE salads constitute an expanding food commodity. While the safety of RTE salads have been extensively studied (Nguyen-The & Carlin, 1994; Francis, Thomas & O'Beirne, 1999; Sapers, Gorny & Yousef, 2006), no impact evaluations of the incidence of *L. monocytogenes* in RTE salads, i.e. RA, have been developed. Nevertheless, other pathogens (*E. coli* O157:H7 and *Salmonella* serovar *Typhimurium*) are being assessed (RA) in iceberg lettuce by a research group from The Netherlands (<http://www.cost920.com/NL05.htm>). Despite no cases of listeriosis in Spain have been associated, to our awareness, with RTE salads, the serious consequences of the disease together with the general concern about the presence of this pathogen in food (particularly foods in which *L. monocytogenes* may grow, like RTE salads), make the RA and RM of *L. monocytogenes* in RTE salads be worth. Szabo, Simons, Coventry and Cole (2003) stated the same reasons when justifying the assessment of control measures to achieve a FSO <100 cfu/g of *L. monocytogenes* in fresh pre-cut iceberg lettuce; however, they did not provide a formal RA as introduced by Codex Alimentarius (1999). Beside the justification mentioned above for this work, the increase in risk of listeriosis that may be occurring as a consequence of the social changes in Spain in the last decades deserves special attention and assessment. The most important changes are the increase of the elderly population (high-risk population) or the scarcity of time for preparing meals at home, which favour the purchase RTE foods.

The objectives of the present work are: i) to estimate the risk of listeriosis (RA) in the Spanish population by consumption of RTE lettuce salads

following the recommendations of Codex Alimentarius (1999); ii) to perform a sensitivity analysis of the risk estimate; and iii) in the light of the previous results, to illustrate with examples how different RM measures can be implemented with the aim of reducing risks.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Framework and working tools

This work conducts a probabilistic Quantitative Microbiological Risk Assessment (QMRA) of *L. monocytogenes* in RTE lettuce salads in Spain, following the guideline provided by Codex Alimentarius (1999). The QMRA covers all steps along the food chain until the time of consumption. The general scheme of the QMRA model can be seen in Figure 1.

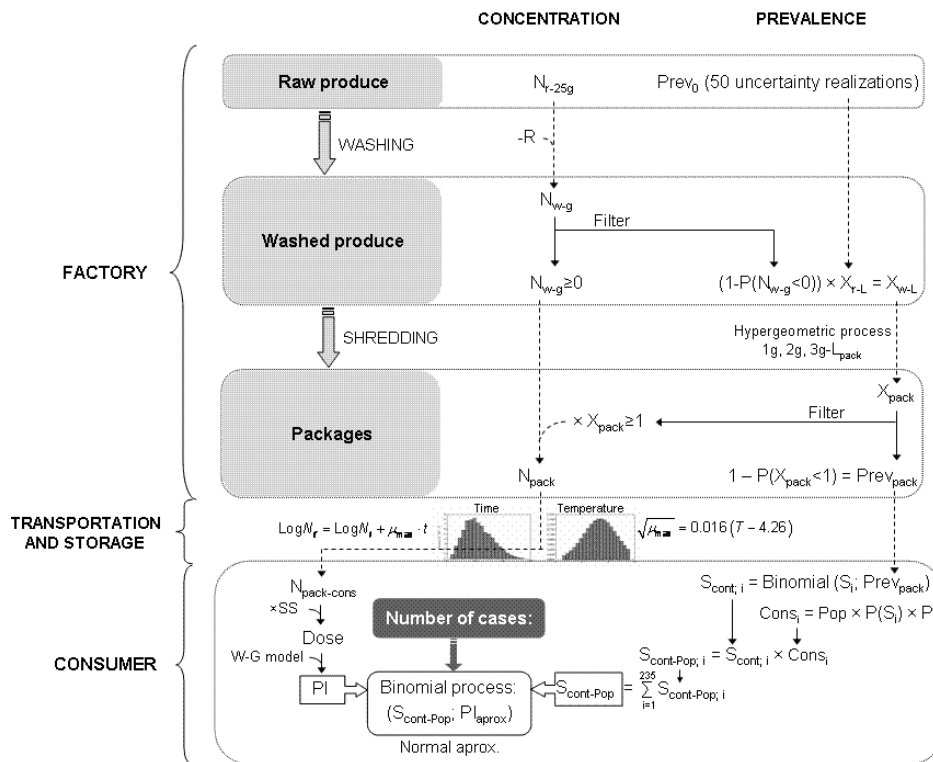


Figure 1: General scheme of the QMRA model of *Listeria monocytogenes* in RTE salads.

Results from sensitivity analysis permitted the implementation of sensible RM measures. QMRA model was built in Excel spreadsheet and simulated by using Palisade @Risk Professional© software. The Nomenclature section contains the abbreviations used throughout the paper together with their descriptions and units. The variables not fully explained through the text are described in the Appendix (Tables A1 to A6).

3.2. Hazard identification

Codex Alimentarius (1999) defined *Hazard identification* as «the identification of biological, chemical, and physical agents capable of causing adverse health effects and which may be present in a particular food or group of foods».

L. monocytogenes is a facultative intracellular bacterial pathogen of both humans and animals. It causes listeriosis in humans, with a variety of symptoms including mild diarrhoea, meningitis and septicaemia (Farber & Peterkin, 1991). *L. monocytogenes* has been found in many foods, and evidence suggests that most exposure is foodborne. Raw and RTE vegetables have been reported to be contaminated by *L. monocytogenes* (Sizmur & Walker, 1988; McLauchlin & Gilbert, 1990; De Simón, Tarragó & Ferrer, 1992; Arnold et al., 1995; García-Gimeno, Zurera-Cosano & Amaro-López, 1996; Nørrung et al., 1999; Francis et al., 1999; Szabo, Scurrah & Burrows, 2000; Guerra et al., 2001; Sagoo, Little & Mitchell, 2003; Loncarevic, Johannessen & Rorvik, 2005). Beside this, several listeriosis outbreaks worldwide have been attributed to consumption of RTE vegetables (Schlech et al., 1983; Ho et al., 1986; Salamina et al., 1996; Fain, 1996). This fact points out that pathogens like *L. monocytogenes*, if present on raw vegetables, may not be fully eliminated by commercial disinfection procedures (e.g. sanitary washing) widely applied in the manufacture of RTE vegetables. Although listeriosis occurs infrequently, at somewhere between 2 and 7 cases per million population, between 20 to 40% of cases are fatal (McLauchlin, 1993; Rocourt, 1994). Major risk factors for acquiring listeriosis are immunosuppression, old age and pregnancy. In Spain, 64 cases of listeriosis were diagnosed in 2005, representing an incidence of 0.2 cases per 100,000 population. In previous years, the number of cases was 100, 52, 49 and 57 in 2004, 2003, 2002 and 2001, respectively. These numbers confirm the fact that listeriosis is a relatively rare disease compared to other common foodborne illnesses such as salmonellosis.

Despite listeriosis is associated with only a few virulent strains, all strains of *L. monocytogenes* were assumed as pathogenic to humans in this work. In this sense, McLauchlin (1997) stated that «in the interests of public safety and for considerations for public health purposes, all *L. monocytogenes*, including those recovered from food, should be regarded as potentially pathogenic».

3.3. Exposure assessment

Exposure assessment was defined by Codex Alimentarius (1999) as the «qualitative and/or quantitative evaluation of the likely intake of biological, chemical, and physical agents via food, as well as exposures from other sources if relevant». In this study, only food was considered as via of transmission of *L. monocytogenes*. A realistic representation of the exposure of the target population (Spain, in this case) to *L. monocytogenes* should be provided. In order to achieve this, it was necessary to gather data related to (i) population, (ii) consumption and (iii) *L. monocytogenes* status (prevalence and concentration) in the food at the time of consumption. Obviously, the more data collated the more refined exposure assessment model. These data were adequately combined mathematical and statistically.

Population

The target population considered in this study was Spain. In 2001, a census was undertaken and results were published in 2004 by the Statistical National Institute of Spain (<http://www.ine.es/>). The population size was 41,180,452 inhabitants. However, because it was assumed that children ≤ 2 years old do not consume RTE salads, the population size submitted to analysis was 39,996,859. A distinction between low- and high-risk populations was made with the aim of a more accurate assessment of the risk. For this purpose, the fractions reported by FAO/WHO (2004) of the total population (tabulated in age \times gender) corresponding to high-risk individuals, were applied to the Spanish population. FAO/WHO (2004) stated that, among adults, high-risk groups should include all adults ≥ 65 years old, pregnant women and individuals with suppressed immune systems and certain medical conditions, such as cancer and recent organ transplantation.

Consumption patterns of RTE lettuce salads

The frequencies of consumption previously obtained (Carrasco, Pérez-Rodríguez, Valero, García-Gimeno & Zurera, 2007b) were assumed for the Spanish population.

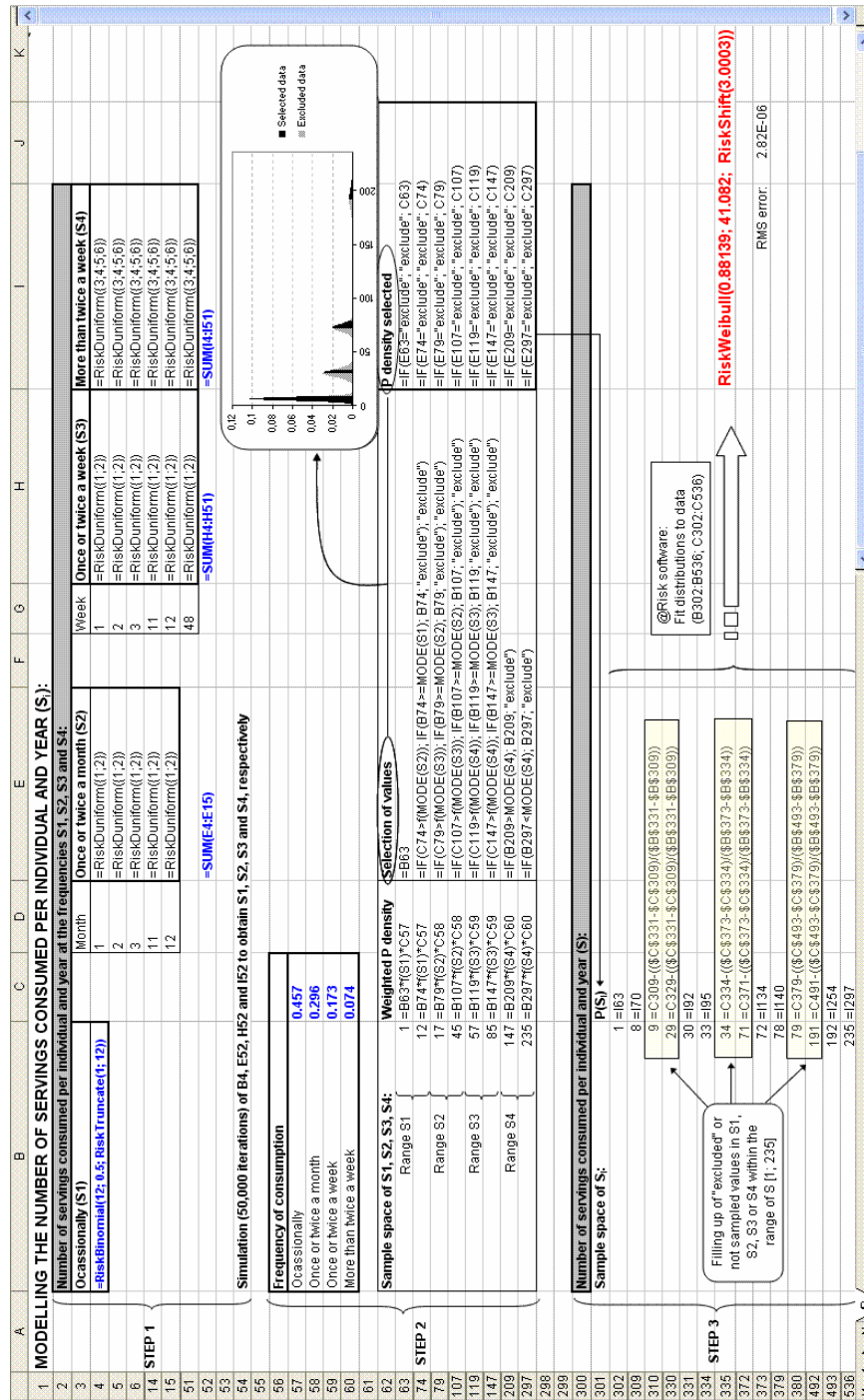


Figure 2: Excel spreadsheet modelling to calculate the number of servings of RTE salads consumed per individual and year (S_i).

Such frequencies (S_1 =*occasionally*, S_2 =*once or twice a month*, S_3 =*once or twice a week* and S_4 =*more than twice a week*) were modelled to obtain a distribution of the number of servings consumed per individual and year (S_i). Three-steps modelling was undertaken to estimate S_i . Firstly, each of the four frequencies was statistically treated as shown in Figure 2, so that probability distributions for S_1 , S_2 , S_3 and S_4 were obtained. Secondly, the sample spaces values of the four distributions were pooled and the probability (P) density of the values was weighted according to the frequencies reported by Carrasco et al. (2007b); thereafter, a procedure of exclusion of values was carried out in order to obtain a descending tendency in the P densities along the x-axis. Lastly, the sample space of S_i was made up by (i) including the values and weighted P densities not excluded in the previous step; and (ii) filling up the ranges where values were excluded in the previous step or not initially sampled (S_1 , S_2 , S_3 , S_4); in these ranges, integer numbers were introduced and the criterion for assignation of P density to those numbers was “gradual decrease of P density along the x-axis” (Figure 2). A set of distributions were fitted to the resultant sample space of S_i and corresponding P densities, and the most appropriate was selected for subsequent calculations.

The survey by Carrasco et al. (2007b) also reported that 75.7% of respondents consume fresh-cut leafy green salads (P_c). This information was included in the RA, as not the whole population is exposed to *L. monocytogenes* via RTE salads. To quantify the uncertainty associated to P_c , a Beta distribution was defined based on the above data (Vose, 2000) (Table A4).

Serving size (SS) is a factor strongly related with the number of cells of *L. monocytogenes* ingested via RTE salads. Table A4 shows the SS distribution applied and the SS data source.

Status of *L. monocytogenes* in RTE lettuce salads at the time of consumption

It is defined by the prevalence and concentration of the pathogen in the food at the time of consumption. The QRMA model described changes in both parameters from manufacture at the factory up to the time of consumption. Figure 3 shows the general food chain of RTE lettuce salads. Steps before manufacture at the factory were not considered in the model because it was assumed that there are no controllable factors influencing the status of *L. monocytogenes* in vegetables.

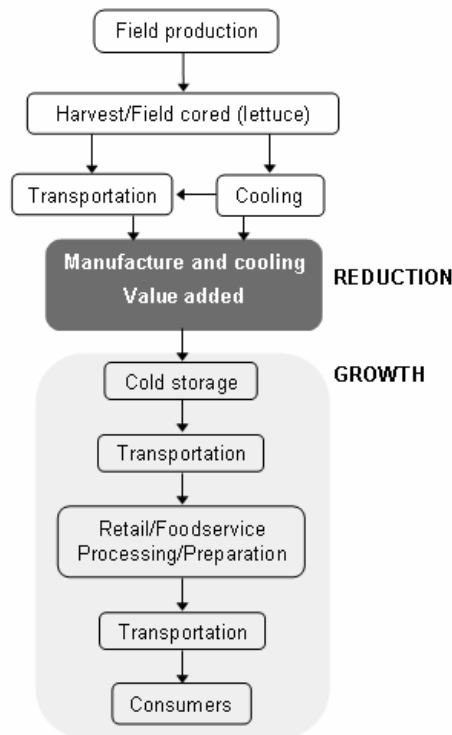


Figure 3: General food chain of RTE salads.

Prevalence ($Prev_0$) and concentration (N_{r-25g}) of *L. monocytogenes* in the raw vegetables, before manufacture, were the initial inputs in the QMRA model. They were defined separately by two cumulative probability distributions (Table A1). $Prev_0$ distribution was built based on literature data (Table 1), and it was assumed to be the prevalence of contamination of heads of lettuce (400 g), residing such contamination in the external part of the heads (100 g).

$Prev_0$ distribution reflected the uncertainty in the QMRA model, and 50 uncertainty realizations of $Prev_0$ were obtained by extracting from the $Prev_0$ distribution (Latin Hypercube sampling) 50 values. Regarding concentration of the pathogen, as no information about the level of *L. monocytogenes* in raw vegetables was available, it was assumed the concentration found by Gombas et al. (2003) for bagged pre-cut leafy salads (Table 2).

At the factory, it was assumed that a lot size of 250 heads of lettuce was manufactured. Two key processes were modelled: washing and shredding

Table 1. ^aPrevalence of *L. monocytogenes* in vegetables.

Source	Food	Number of samples	Prevalence (%)	^b F(x)
Lin, Fernando and Wei (1996)	Vegetable salads	63	1.6	0.1
Velani and Roberts (1991)	Salad vegetables (intact vegetable)	108	1.8	0.2
Breer and Baumgartner (1992)	Salad vegetables	263	2.3	0.3
Tang, Cheong and Zainuldin (1994)	Lettuce (intact vegetable)	28	3.6	0.5
U.S.Department of Agriculture (2003)	Vegetables	9,223	3.6	
Legnani, Leoni, Berveglieri, Mirolo and Alvaro (2004)	Raw vegetables	43	6.9	0.6
De Simón, Tarragó and Ferrer (1992)	Vegetables	103	7.8	0.7
Harvey and Gilmour (1993)	Raw vegetables	66	10.6	0.8
Arumugaswamy, Ali and Hamid (1994)	Leafy vegetables	22	22.7	0.9

^aThe maximum value in the distribution (0.50) was the maximum prevalence we found in literature (Gunasena, Kodikara, Ganepola & Widanapathirana, 1995).

^bF(x) is the cumulative probability $F(x) = i/n + 1$, where *i* is the rank of the observed data point and *n* is the number of data points (9 surveys) (Vose, 2000).

(Figure 1). The washing step was aimed at reducing the load of microbial flora and pathogens as well as the prevalence. As can be seen in Figure 1, the washing step resulted in both reduction of concentration of the pathogen ($N_{r-25g} \rightarrow N_{w-g}$) and reduction of the prevalence in the lot in terms of contaminated grams ($X_{r-L} \rightarrow X_{w-L}$). The values of $N_{w-g} \geq 0$ were submitted to fit by @Risk software for subsequent calculations. Washing with the use of chlorinated water was the assumed sanitary treatment, and data taken from literature were used to define a Normal distribution for reduction (R) of *L. monocytogenes* (Table A2). The shredding step was assumed to yield pieces of 1, 2 and 3g at equal weight proportions, i.e. grams 1g- L_L = grams 2g- L_L = grams 3g- L_L . To obtain the number of contaminated pieces of lettuce falling into 200-g packages (1g, 2g, 3g- L_{pack}) a hypergeometric process, approximated with a binomial distribution was applied. Finally, it was obtained the concentration of *L. monocytogenes* in each pack (N_{pack}) for the 50 uncertainty

realizations of $Prev_{\text{pack}}$. A detailed description of the modelling process and assumptions made are shown in Figure 4.

Table 2. Concentration assumed for *L. monocytogenes* in vegetables (Gombas et al., 2003).

Concentration (cfu/g)	Concentration (Log ₁₀ cfu/g)	Concentration (Log ₁₀ cfu/25g)	^a Number of positive samples	f(x)	F(x)
0.04-0.1	(-1.4)-(-1)	0-0.4	17	0.77	0.77
0.1-1	(-1)-0	0.4-1.4	1	0.04	0.82
1-10	0-1	1.4-2.4	1	0.04	0.86
10-10 ²	1-2	2.4-3.4	2	0.09	0.95
10 ² -10 ³	2-3	3.4-4.4	1	0.04	1

^aThe total number of samples analyzed was 2,966.

After packaging of RTE salads, they are stored and transported at refrigeration temperatures until reaching retail points or foodservice centres. We considered negligible the effect that these stages could have on the concentration of the pathogen in the food, as RTE salads are rapidly delivered after manufacture. However, the subsequent steps, storage at *retail/foodservice* points, *transport* from these to home, and *storage at home* were included in the modelling of growth of *L. monocytogenes*. To predict the growth of *L. monocytogenes* on RTE salads throughout these steps, the Ratkowsky type predictive model of Koseki and Isobe (2005a) was applied because of its food specificity (lettuce):

$$\sqrt{\mu_{\max}} = 0.016 \cdot (T - 4.26) \quad (1)$$

where μ_{\max} is the maximum growth rate (log₁₀ cfu/h) and T is temperature (°C). In this equation, temperature distributions for the steps *retail/foodservice* (Temp_R) and *storage at home* (Temp_H) were introduced; in the case of *transport* (Temp_T), an equation describing the increase of temperature (°C) as a function of the time until reaching home was employed. Table A3 shows the probability distributions employed and sources reference.

In the case of *storage at home*, temperature profiles from 30 domestic refrigerators were recorded during a 24-h period (Carrasco et al., 2007b). By using the Eq. 1, together with the equation of exponential growth (Eq. 2), it was calculated the increase on the level of *L. monocytogenes* for each refrigerator (each of 30 temperature profiles).

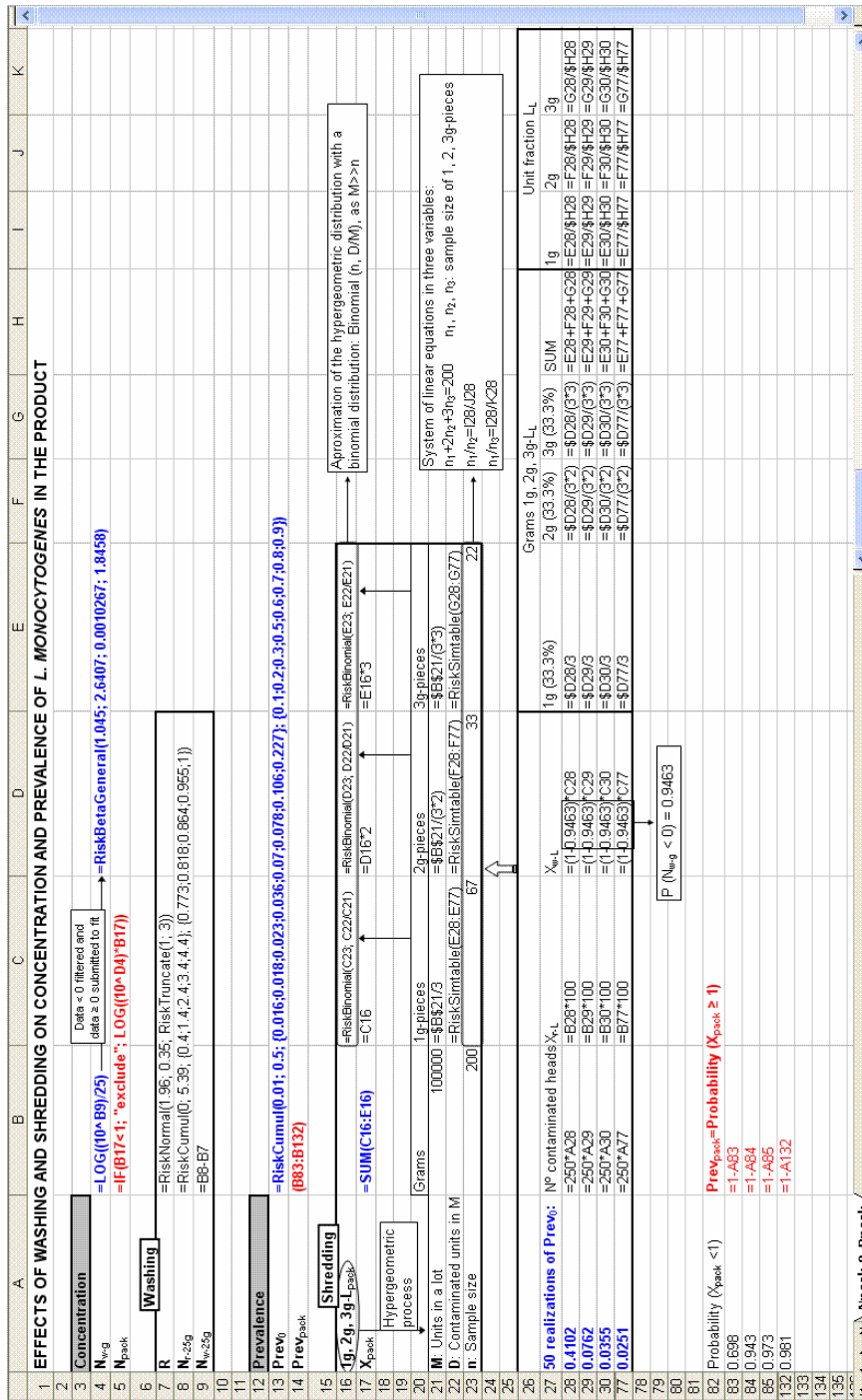


Figure 4: Excel spreadsheet modelling of washing and shredding of lettuce at the factory to calculate Prev_{pack} and N_{pack}.

$$\text{Log}N_f = \text{Log}N_i + \mu_{\max} \cdot t \quad (2)$$

where N_f is the concentration of cells (cfu/g) at the end of the stage considered, N_i is the concentration of cells (cfu/g) at the beginning of the stage, μ_{\max} is the maximum growth rate (\log_{10} cfu/h) and t is the duration of the stage (h).

Subsequently, it was calculated the “effective” static temperature causing the same increase as above by substituting μ_{\max} from Eq. 2 in Eq. 1, as can be seen in Eq. 3:

$$T_{\text{eff}} = \sqrt{\frac{\log_{\text{inc}}}{t}} - 4.26 \quad (3)$$

where T_{eff} is the “effective” static temperature ($^{\circ}\text{C}$), t is the time during which temperature was recorded (h), and \log_{inc} is the increase of *L. monocytogenes* (\log_{10} units) at the temperature profile of each refrigerator. A probability distribution (Temp_H) was fitted to the 30 T_{eff} calculated (Table A3).

At each step (*retail/foodservice, transport and storage at home*), the μ_{\max} obtained was introduced in the equation of exponential growth (Eq. 2) to calculate the concentration of cells after each step.

In order to limit the growth of *L. monocytogenes* at a certain level (stationary phase), an equation for the maximum population density (MPD) given by Koseki et al. (2005a) was applied:

$$\text{MPD} = 0.037 \cdot T + 12.434 \quad (4)$$

where MPD is the maximum population density (\ln cfu/g) and T is temperature ($^{\circ}\text{C}$).

The duration of each step (time_R , time_T and time_H) was described by means of Triangular distributions, detailed in Table A3. It was considered a negative correlation between time and temperature of storage at home, as it is reasonable to think that, the higher the temperature, the faster the spoilage of RTE salads and shorter the storage time at home. A negative correlation value of 0.25 was used (U.S. Department of Agriculture, 2003).

3.4. Hazard characterization

Codex Alimentarius (1999) defined Hazard characterization as the «qualitative and/or quantitative evaluation of the nature of the adverse health

effects associated with the hazard. For the purpose of Microbiological Risk Assessment the concerns relate to microorganisms and/or their toxins».

In the present RA, the Weibull-Gamma (W-G) model developed by Farber, Ross and Harwing (1996) was used. The W-G model is a “single-hit” model which assumes that, whichever the dose is, there is always (at least in a mathematical sense) a non-zero probability of infection or illness, as infections may result from the survival of a single, viable, infectious, pathogenic organism (FAO/WHO, 2003). The W-G model is:

$$PI = 1 - \left[1 + (D^b)/\beta \right]^{-\alpha} \quad (5)$$

where PI is the probability of illness for an individual exposed to D cells, D is the dose (cfu/serving), b is a parameter which determines the shape of the individual dose response curve, and α and β are the parameters of the Gamma distribution describing the heterogeneity host/pathogen. The values considered for the parameters were: $\alpha = 0.25$, $b = 2.14$ and $\beta = 10^{15.26}$ or $10^{10.98}$, depending β on whether the characterization was performed in low-risk population or high-risk population.

3.5. Risk characterization

While the order of presentation of the previous RA steps does not follow a chronological order, Risk characterization is, undoubtedly, the last step of a RA. According to Codex Alimentarius (1999), risk characterization is «the process of determining the qualitative and/or quantitative estimation, including attendant uncertainties, of the probability of occurrence and severity of known or potential adverse health effects in a given population based on Hazard identification, Hazard characterization and Exposure assessment».

It was estimated the risk of listeriosis in the Spanish population, by integrating the results from the previous steps, as shown in Figure 1. The number of cases of listeriosis among low- and high-risk population was simulated (10,000 iterations) for the 50 uncertainty realizations of $Prev_{pack}$ and N_{pack} obtained in the Exposure assessment above. At each uncertainty calculation, a random value of P_c was assigned. PI was assumed to follow a Normal distribution and was described according to the central limit theorem (Table A5). The number of cases followed a binomial process; however, because of the high number of servings consumed ($S_{cont-Pop}$), a normal approximation of the binomial distribution was used (Table A5).

3.6. Sensitivity analysis

Sensitivity analysis is a tool which allows determining the effects of inputs on output of a model, i.e. quantify how sensible is an output to inputs changes. A sensibility analysis was performed for the outputs *Number of cases in low-risk population* and *Number of cases in high-risk population*. The inputs selected for the analysis were those probability distributions entering the mathematical model: $N_{\text{pack-cons}}$, Temp_R , Temp_H , time_R , time_T , time_H and SS . The sensitivity analysis method applied was that provided by Palisade @Risk Professional[®] software for Advanced Sensitivity Analysis, in which a number of simulation are run for each input. Several inputs “steps” are fixed by the user, and a simulation is performed at each “step”. In this work, the inputs “steps” were set at various percentiles (1th, 5th, 25th, 50th, 75th, 95th and 99th), and each was simulated with 500 iterations (Latin Hypercube sampling).

3.7. Risk management

FAO/WHO (2006) reported examples of RM options that would benefit from the availability of a RA to achieve specific RM goals (Table 3). We went through these goals and options, and analyzed their application in reducing the risk of listeriosis by RTE lettuce salads consumption. We tested four hypothetical RM measures in order to reduce the disease burden (Table 3).

The RM measures were implemented in the model as follows:

- ✓ For the first measure, we assumed that an effective risk communication programme would result in a 50% reduction of the probability of consumption of RTE lettuce salads by the high-risk population (P_c for high-risk population was halved).
- ✓ In the second measure, three microbiological criteria were applied ($n=10$ $c=0$; $n=20$ $c=0$ and $n=30$ $c=0$; absence in 25 g in the three of them) at primary production. This was applied by selecting only those prevalence data sources (Table 1) presenting major or equal confidence than 95% fixed in the above sampling plans. Such confidence was evaluated in distributions (Beta distributions) built for the uncertainty of prevalence of data from Table 1 and the uncertainty of the three microbiological criteria. These distributions were $UPrev_{n10}$, $UPrev_{n20}$, $UPrev_{n30}$ and $UPrev_{\text{source}}$, described in Table A6. From the Beta distributions of the microbiological criteria, a target 95% percentile was fixed, and the

Table 3. Examples of RM goals and options proposed by FAO/WHO (2006) and measures adopted in this work.

RM goals	RM options available to achieve these goals	Measures adopted in this work
-Avoid exposure to a specific food.	-Ban production and/or harvest. -Ban importation.	
-Reducing consumer exposure to hazards in specific foods.	-Informing vulnerable consumers (and caregivers) not to eat specific foods. -Preventing a food from entering the food chain.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Prevent high-risk consumers from exposure to RTE salads (by means of Risk Communication)
-Control initial levels of hazards in raw ingredients derived from primary production or those ingredients entering the processing environment.	-Using microbiological criteria to identify and reject unacceptable ingredients. -Selecting ingredients that have undergone reduction treatment.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Application microbiological criteria at primary production (raw vegetables)
-Prevent an increase in contamination and the level of a hazard in a food.	-Development and implementation or review of current Codes of Practice addressing GAP/GMP/GHP/HACCP. -Reduce additional (re)contamination and growth of pathogens.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduction of shelf-life of RTE salads ▪ Use of specific mixture of gases in packages of RTE salad at the factory
-Reduce level of hazard in a food.	-Implementation of selected processing operations which eliminates or reduces pathogens.	
-Remove pathogen from a food.	-Implementation of processing operations which remove pathogens.	
-Do nothing (maintain status quo).	-Not applicable.	

corresponding value was introduced as target value in the Beta distributions of the data sources; if the corresponding percentiles were greater than 95%, such data sources were selected. From this selection, different initial cumulative distributions for prevalence (equivalent to $Prev_0$ in the baseline model) were built: $Prev-M_{n10}$, $Prev-M_{n20}$ and $Prev-M_{n30}$ (Table A6).

- ✓ Thirdly, a reduction of shelf-life was assumed by truncating the distribution of $time_H$ at 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 days.
- ✓ As last measure, we assumed packages of RTE lettuce salads with injection of gases at the factory. We used previous results reported by Carrasco, Pérez-Rodríguez, Valero, García-Gimeno and Zurera (2007a), in which packages of iceberg lettuce presented a specific initial gas composition (carbon dioxide \approx 5.5%, oxygen \approx 3% and nitrogen \approx 92.5%), in contrast with the packages of iceberg lettuce (without any injection of gases) upon which our baseline growth model was constructed (Koseki & Isobe, 2005b). As a worst case, it was assumed a temperature abuse of 13°C during the stages of storage at retail, transportation and storage at home. To allow comparison, the same temperature (13°C) was applied in our baseline model through the same stages. From the work of Carrasco et al. (2007a), a $\mu_{max} = 0.019 \log_{10} \text{ cfu/h}$ and a $MPD = 7.40 \log_{10} \text{ cfu/g}$ were used.

The modified QMRA model for each RM measure was simulated with 10,000 iterations and the number of cases of listeriosis was estimated for low- and high-risk population.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Population characteristics

The low- and high-risk population in Spain, submitted to RA was distributed by gender and age as shown in Table 4. From the population size submitted to risk analysis, i.e. 39,996,859, a fraction of 0.24 corresponded to high-risk population.

The number of servings consumed per individual and year (S_i) was described by a Weibull distribution (Figure 5). It can be seen the adjustment

Table 4. Population of Spain allocated to low-risk and high-risk groups, using the factors reported by FAO/WHO (2004).

Low-risk population				High-risk population			
Age	Gender		Total	Age	Gender		Total
	Male	Female			Male	Female	
0-4	0	0	0	0-4	379,848	359,644	739,492
5-17	2,698,897	2,556,872	5,255,769	5-17	83,471	79,079	162,550
18-34	5,503,870	4,791,816	10,295,687	18-34	170,223	653,430	823,652
35-49	4,332,870	4,106,905	8,439,775	35-49	134,006	357,122	491,128
50-64	3,076,782	3,225,511	6,302,293	50-64	95,158	99,758	194,916
65-74	0	0	0	65-74	1,799,682	2,137,751	3,937,433
74+	0	0	0	74+	1,276,170	2,077,994	3,354,164
SUM			30,293,523				9,703,336

of the curve to consumption data ($RMSE = 2.82 \times 10^{-6}$), showing that consumption of RTE salads in Spain is generally low. In contrast with Spanish consumption, in Belgium, the consumption frequencies reported (Ragaert, Verbeke, Devlieghere & Debevere, 2004) were distributed as follows: 57.1% purchased minimally processed vegetables or packaged fruits once a week, 35.4% once a month, and only 7.5% less than once a month.

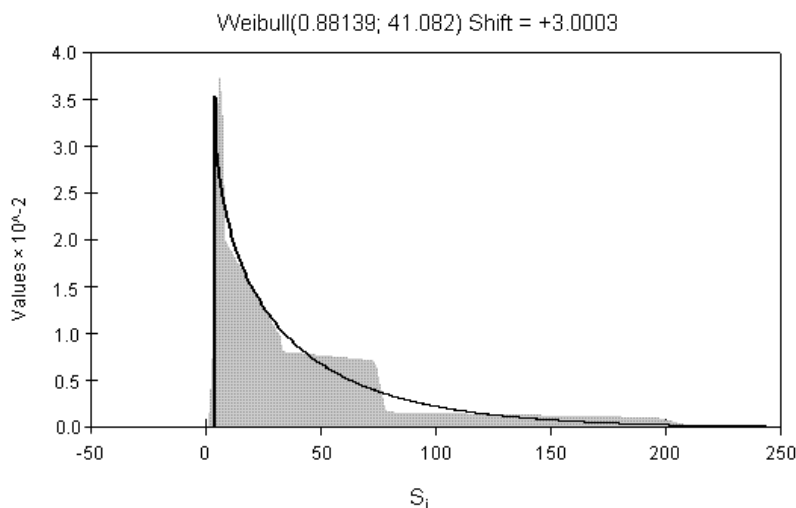


Figure 5: Number of servings of RTE salads consumed per individual and year (S_i).

These frequencies are opposite to the frequency distribution used in this study to model S_i (Carrasco et al., 2007b): 7.41% more than twice a week, 17.28% once or twice a week, 29.63% once or twice a month and 45.68%

occasionally. In this work, taking into account the Weibull distribution for S_i and the population size submitted to risk analysis, the number of servings consumed in Spain per year was 1.37×10^9 , which would mean 1.71 Kg per capita in a year (assuming a SS of 50 g, i.e. the SS mean of this work). For this calculation, it was assumed that both low- and high-risk populations follow the same consumption pattern S_i . This number is in accordance with the consumption reported by Lobo and González (2006) in Spain (annual consumption = 1.5-2 kg per capita of minimally-processed produce in 2005), and in contrast with consumption patterns of other countries, such as France, with 6 kg per capita, or United States, with 30 kg per capita (Lobo et al., 2006).

4.2. Prevalence and concentration of *L. monocytogenes* in the product

Regarding the status of *L. monocytogenes* in the product, two main facts are remarkable along the food chain: (i) reduction of the concentration and prevalence at the factory, and (ii) increase of the concentration of the pathogen during transport and storage (Figure 3). Reduction was result of the washing step at the factory. At the factory, simulated concentration of the pathogen after washing ($N_{w-g} \geq 0$) was defined by a BetaGeneral distribution (χ^2 test; $P = 0.1903$), as shown in Figure 6, which was used as input for the next step in the QMRA model, i.e. calculation of N_{pack} .

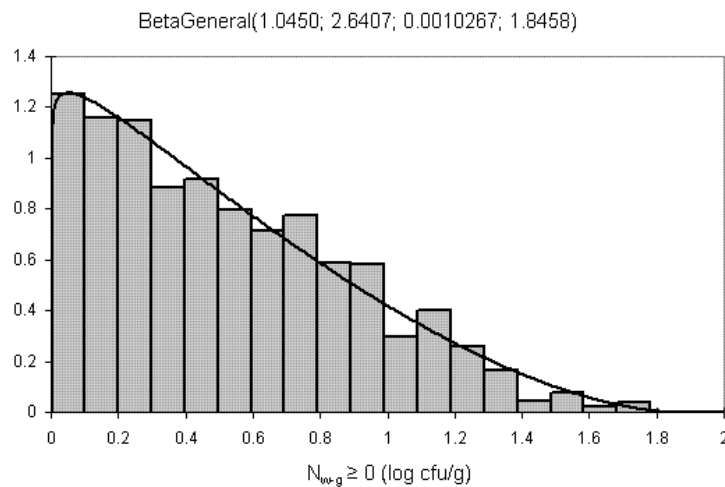


Figure 6: Concentration of *L. monocytogenes* (\log_{10} cfu/g) in the washed product ≥ 0 ($N_{w-g} \geq 0$).

The decrease of prevalence was result of assuming that simulated values of $N_{w-g} < 0$ were free of *L. monocytogenes*. These values comprised a

cumulative probability = 0.9463, whose complement was multiplied by the contaminated grams in the lot being processed (X_{T-L}) to yield X_{W-L} , as shown in Figures 1 and 4. Shredding and distribution of lettuce in 200-g packages resulted in $Prev_{pack}$ (50 uncertainty realizations) which ranged from 0.0074 to 0.3428, with a $Prev_{pack}$ median = 0.0269. Figure 7 represents the transition from $Prev_0$ to $Prev_{pack}$, as result of the processes taking place at the factory.

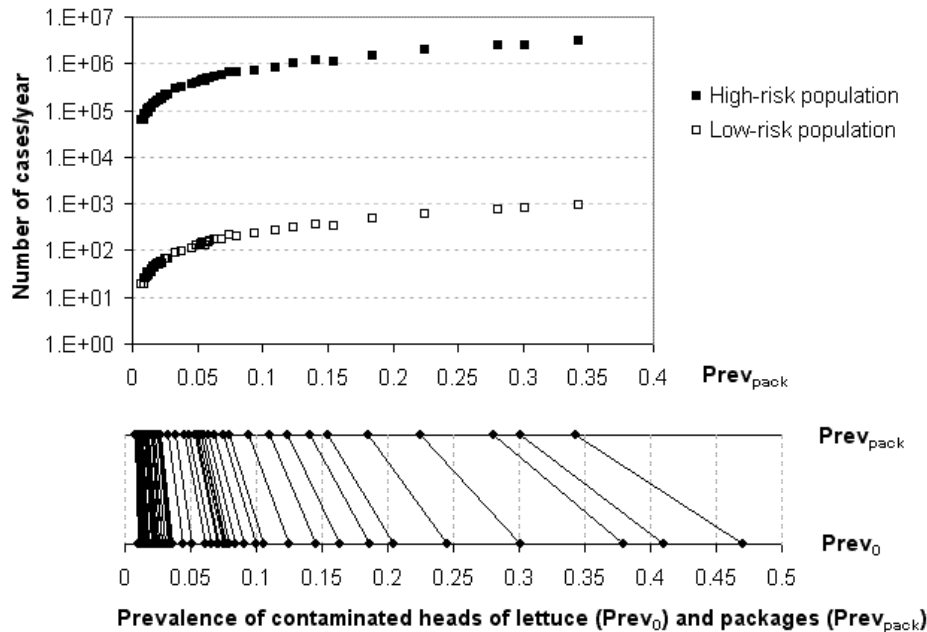


Figure 7: Mean number of cases/year in low- and high-risk population vs prevalence of packages ($Prev_{pack}$) and transition from initial prevalence ($Prev_0$) to $Prev_{pack}$.

During storage at *retail*, *transport* and *storage at home*, the time and temperature operating in these stages permitted the growth of *L. monocytogenes* until reaching $N_{pack-cons}$ at the time of consumption. Throughout the model, the variables dealing with concentration and prevalence of *L. monocytogenes*, represented the variability and uncertainty, respectively, of the QMRA model. Codex Alimentarius (1999) recommended the inclusion of uncertainty and variability in RA, although no methodologies were indicated. Vose (2000) pointed out the usefulness of keeping these two components separate. Prevalence and concentration of *L. monocytogenes* in foods are often considered to be related properties, particularly at very low concentrations (FAO/WHO, 2004). However, it has been recognized the inconvenience of assuming one distribution to represent

both prevalence and concentration. Pérez-Rodríguez, van Asselt, García-Gimeno, Zurera and Zwietering (2007) illustrated this inconvenience with an example. In this work, both components were described separately by empirical distributions, since the use of a theoretic or parametric model would be hard to justify with our limited knowledge on the prevalence and levels of *L. monocytogenes*. These types of data were scarce in Spain. Coordination and cooperation between Sanitary Authorities and industries should be encouraged to provide microbiological data to risk managers and assessors.

At the time of consumption, the amount of *Listeria* cells ingested, i.e. the dose, depends on $N_{\text{pack-cons}}$ and serving size (SS) (Figure 1). The simulated dose distribution of *L. monocytogenes* (\log_{10} cfu/serving) for $\text{Prev}_{\text{Vpack}}$ median can be observed in Figure 8. Figure 8 reveals a concentration of high doses (right zone of the distribution), which is consequence of an extensive growth of *L. monocytogenes* during refrigerated storage, reaching the MPD or close values. In this way, doses $> 4.5 \log_{10}$ cfu/serving (32% of dose values) corresponded to levels of the pathogen after refrigerated storage ($N_{\text{pack-cons}}$) concentrated between 5.4-5.7 \log_{10} cfu/g. These results are consistent with those reported by the study by Pérez-Rodríguez et al. (2007), concluding that *L. monocytogenes* could grow up to levels of MPD from low initial concentrations because of the recognized psychrotrophic nature of the pathogen.

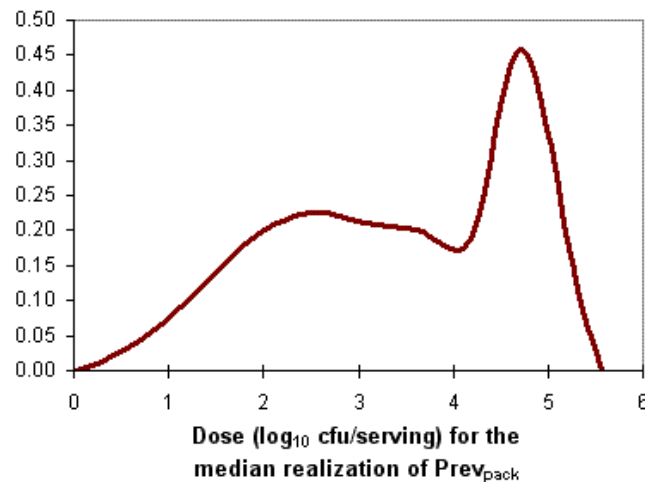


Figure 8: Dose (\log_{10} cfu/serving) for the median uncertainty realization of $\text{Prev}_{\text{Vpack}}$.

4.3. Hazard and Risk characterization

Various attempts have been made to model the probability of infection/illness of *L. monocytogenes*. In this sense, Rocourt, BenEmbarek, Toyofuku and Schlundt (2003) revised a number of dose-response relationships for *L. monocytogenes* that have been described and are based on different end-points and types of data. Notermans and Hoornstra (2000) pointed out that the dose-response relationships established to date have shown large variations, and their value resides in the estimation of the relative effect of several control options. In this work, the Weibull-Gamma dose-response model was employed because of its good fit to different datasets of various foodborne diseases (Holcomb, Smith, Ware, Hung, Brackett & Doyle, 1999) and its wide application in RA of *L. monocytogenes*. The different PI values given by the W-G model for the 50 uncertainty realizations of the model showed slight variation. For high-risk population, PI means and standard deviations varied between 2.40×10^{-2} - 2.60×10^{-2} and 6.10×10^{-2} - 6.30×10^{-2} , respectively; and for low-risk population, the ranges were 2.45×10^{-6} - 2.63×10^{-6} and 9.01×10^{-6} - 9.28×10^{-6} , respectively.

These PI values, together with the 50 uncertainty realizations of $PreV_{pack}$, yielded differences of $\approx 1.7 \log_{10}$ units (multiplicative factor ≈ 39) (Figure 7) in the mean number of cases in both low- and high-risk population, that is, the difference between those cases corresponding to the maximum and minimum uncertainty realization of $PreV_{pack}$. Figure 7 shows the mean number of cases/year in low- and high-risk population, corresponding to the 50 uncertainty realizations of $PreV_{pack}$. In high-risk population, the number of cases was $3.5 \log_{10}$ units greater than in low-risk population. In contrast with our results, Lindqvist and Westöö (2000) obtained the same order of magnitude for both subpopulations. This could be explained by the dose distribution they obtained, with high dose levels of up to $8 \log_{10}$ cfu/serving, and the situation of these levels at the right zone of the x-axis of the W-G model (Farber, Ross & Harwig, 1996). Bemrah, Sanaa, Cassin, Griffiths and Cerf (1998) obtained $\approx 1 \log_{10}$ unit difference in the number of cases between high risk and low risk subpopulations.

The European legislation dealing with microbiological criteria for foodstuffs (Regulation (CE) N° 2073/2005), establishes a maximum microbiological criterion of 100 cfu/g for *ready-to-eat foods able to support the growth of L. monocytogenes, other than those intended for infants and for special medical purposes*. It also established that this criterion must apply

throughout the shelf-life of the product. Focusing on our work, it would mean a maximum concentration of *L. monocytogenes* of 100 cfu/g at the time of consumption; in other words, a value for $N_{\text{pack-cons}}$ of 4.30 \log_{10} cfu/package (a package = 200 g). By selecting only those simulated values of $N_{\text{pack-cons}} \leq 4.30$, the probability of infection (PI) mean and standard deviation would decrease until 2.72×10^{-5} and 1.28×10^{-4} , respectively, for low-risk population, and 1.43×10^{-9} and 6.76×10^{-9} , respectively, for high-risk population. These numbers are around 2-3 \log_{10} units lower than those reported above, in the baseline model. Lindqvist et al. (2000), in demonstrating this, found 2 orders of magnitude difference by using the exponential dose-response model for PI. In this work, the new PI values calculated were implemented in the QMRA model for the case of $\text{Prev}_{\text{pack}}$ median, resulting in a mean number of cases of 4×10^{-2} and 244 cases for low- and high-risk population, respectively. If, instead of $\text{Prev}_{\text{pack}}$, it is taken the prevalence value reported by the Spanish zoonoses report of 2004 (EFSA, 2004) (7 positive vegetable samples out of 146), the estimated number of cases would be practically the same (5.75×10^{-2} and 350 cases for low- and high-risk population, respectively). These numbers are approximately at the same level of the cases reported in Spain, and, although the cases of listeriosis may be attributed to other sources (not only RTE salads lettuce), it should be born in mind the occurrence of cases underreported. The number of cases of listeriosis/year reported in Spain from 2001 to 2005 were 57, 49, 52, 100 and 67 (EFSA, 2006).

In our baseline model, the level 100 cfu/g is exceeded during the shelf-life of RTE lettuce salads, given the growth model employed, and the temperatures and times assumed in the three growth stages. Such level corresponded to the 51.6% percentile of the simulated data of $N_{\text{pack-cons}}$. Temperature and time data were taken from literature, and, except for the case of Temp_H , the other data sources belonged to United States. Future collection of data in Spain may allow a more refined quantitative RA. Beside this, the growth model employed could be a matter of discussion, as the packaging of lettuce of the model source (Koseki et al., 2005b) may not represent that of the majority of RTE salads in the market. Koseki et al. (2005b) packed iceberg lettuce without initial flushing of gases, and the growth model was based upon such product. Nevertheless, nowadays, it is a common practice to use a mixture of gases when packaging. It has been found that the typical gases employed in the mixture (often 5-10% CO_2 ; 0.5-3% O_2 and balance of N_2) delay the growth of *L. monocytogenes* (Carrasco, Pérez-Rodríguez, Valero, García-Gimeno & Zurera, 2007a). Unfortunately, to our

awareness, there is no available growth model for *L. monocytogenes* in lettuce salads including carbon dioxide as a factor, apart from temperature. Below it is demonstrated the effect that a particular mixture of gases has on the growth of *L. monocytogenes*.

Following the concepts and definitions given by FAO/WHO (2006), the last incidence reported in Spain, i.e. 67 cases of listeriosis in 2005, is the ALOP, that is «an expression of the level of protection achieved in relation to food safety control measures in place at the current time». If the currently achieved public health status changed (for example, new technologies may change the level of *L. monocytogenes* in the food), the ALOP would be revised over time. The incidences reported in Spain from 2001 to 2005 do not show a clear tendency of improvement of public health status. It is suggested that not only ALOP should be revised when improved the public health status, but also when a reduction in the number of cases is decided to be appropriate by risk managers.

4.4. Sensitivity analysis

Figure 9 shows tornado graphs for low- and high-risk population corresponding to the median realization of $PreV_{pack}$.

It can be seen that the sensitivity ranking of inputs is the same for both subpopulations. However, in high-risk population, temperature and time at retail and home ($Temp_R$, $time_R$, $Temp_H$, $time_H$) and $N_{pack-cons}$, take more influence on the output than in low-risk population.

It is observed that SS is a factor strongly related to the number of cases; however, it can not be conceived of as a Risk Management target to reduce the disease burden. Quite the contrary, the consumption of vegetable, RTE or fresh, is being promoted with health initiatives campaigns such as the program “Fruits & Veggies – More Matters™” (<http://www.fruitsandveggiesmorematters.org/>).

$Temp_H$ was the second input that most influenced the variation in the mean number of cases. Temperature is a primary factor in controlling the rate of growth of *L. monocytogenes* (Buchanan, Stahl & Whiting, 1989). It seems to be adequate to develop programs for consumer’s education as a risk management strategy. The RA carried out by U.S. Department of Agriculture (2003) identified *refrigerated storage temperature* as one of the five broad factors that affect consumer exposure to *L. monocytogenes*. The others were:

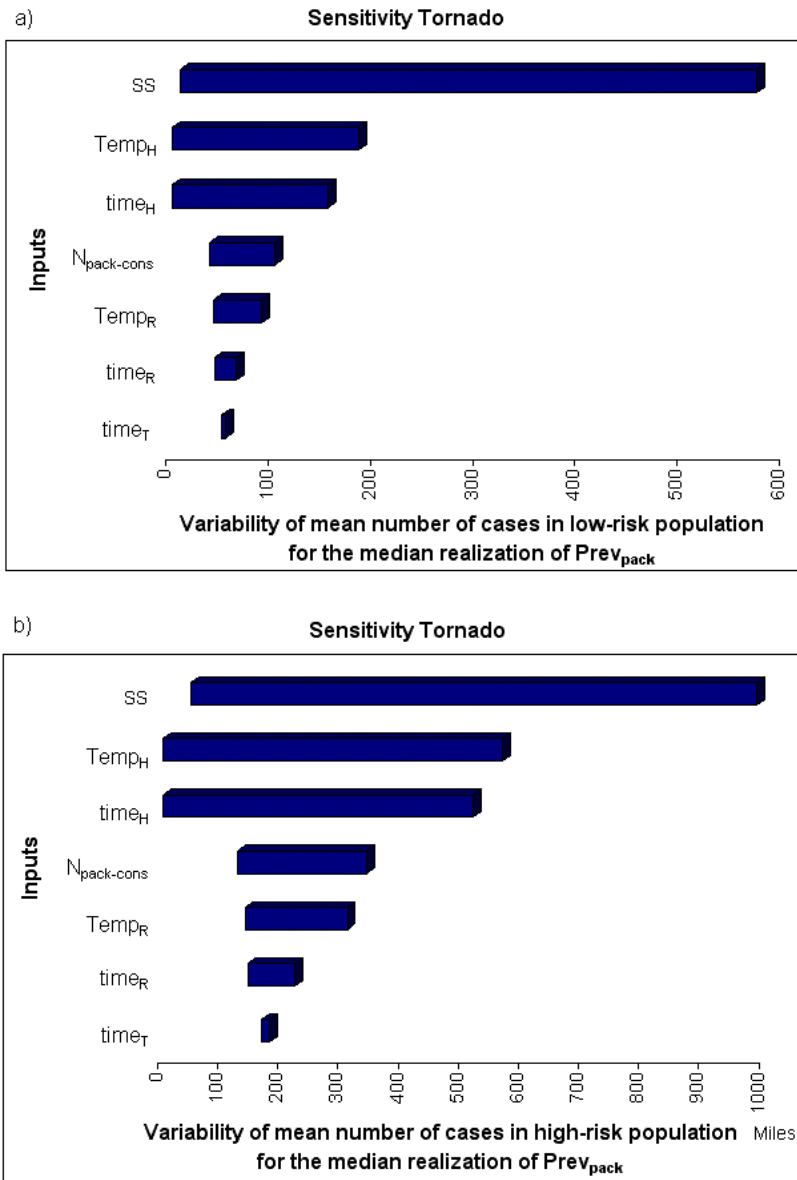


Figure 9: Tornado graphs of sensitivity of the mean number of cases/year to various inputs in low- and high-risk population.

amount and frequency of consumption of a RTE food, frequency and levels of L. monocytogenes in a RTE food, potential of the food to support the growth of the pathogen during refrigerated storage, and duration of refrigerated storage.

The third and four inputs in tornado graphs were $time_H$ and $N_{pack-cons}$. They were considered as potential RM targets, as they may be more feasible to be changed, from a public perspective, than $Temp_H$. The level of contamination in the food product investigated by Lindqvist et al. (2000) was the factor to which the probability of illness was most sensitive. However, these authors did not model the processes taking place along the food chain, i.e. any temperature, time or other factor that may affect the status of the pathogen in the product.

4.5. Risk Management measures to reduce disease burden

Together with other tools, such as epidemiology based tools and economic analysis, RA can provide a sound scientific foundation for “risk-based” management systems (FAO/WHO, 2006). The public health benefits from implementation of the RM measures adopted in this work are presented in Table 5. Reductions in the number of cases in low- and high-risk population were practically equal, except for the first and third RM measure. In the latter case, the reason is obvious; in the former, it will be explained below.

The RM measure which produced the major reduction in the number of cases was the use of a specific mixture of gases. With this measure, $N_{pack-cons}$ decreased. Among the different gases that could be employed, carbon dioxide has been widely studied as inhibitor of the growth of *L. monocytogenes* (Bennik, Peppelenbos, Nguyen-The, Carlin, Smid & Gorris, 1996; Francis & O’Beirne, 1998). The challenge test carried out by Carrasco et al. (2007a) showed that the effect of the mixture of gases applied retarded the growth (lower maximum growth rate) and extended the MPD. The maximum growth rate applied in this RM measure ($0.019 \log_{10} \text{ cfu/h}$ at 13°C) resulted in a distribution of $N_{pack-cons}$ with generally lower values than before; for example, the 85.9% of values were $\leq 4.30 \log_{10} \text{ cfu/package}$ ($\leq 100 \text{ cfu/g}$), unlike the 51.6% obtained in the baseline model. Notwithstanding, given the new MPD applied in the RM measure, certain percentage of $N_{pack-cons}$ values (1.5%) were greater than the MPD at 13°C in the baseline model ($5.6 \log_{10} \text{ cfu/g}$). This percentage was responsible for <1% of higher doses (between 5.6 and $6.9 \log_{10} \text{ cfu/serving}$) than in the baseline model. These levels of high doses are located in the right zone of the W-G model (Farber et al., 1996), whose curve is different for low- and high-risk population; for the low-risk, the dose-response curve is, at these dose levels, in the exponential form, while for the case of high-risk population, it has already reached a “plateau”,

Table 5. Ranking of risk management measures according to the reduction of burden of listeriosis in Spain in the total population.

RM measures adopted in this work	Reduction percentage (%)		
	Low-risk population	High-risk population	Total population
1. Use of specific mixture of gases	66	95	95
2. Reduction of shelf-life: 4-days t_{mH}	85	84	84
3. Prevent high-risk consumers from consumption of RTE salads	0	75	75
4. Reduction of shelf-life: 5-days t_{mH}	64	62	62
5. Microbiological criterion at primary production: $n=30$; $c=0$; absence in 25 g	44	44	44
6. Microbiological criterion at primary production: $n=20$; $c=0$; $c=0$; absence in 25 g	42	43	43
7. Reduction of shelf-life: 6-days t_{mH}	42	40	40
8. Reduction of shelf-life: 7-days t_{mH}	26	24	24
9. Reduction of shelf-life: 8-days t_{mH}	13	11	11
10. Microbiological criterion at primary production: $n=10$; $c=0$; $c=0$; absence in 25 g	6	8	8
11. Reduction of shelf-life: 9-days t_{mH}	5	4	4

near the maximum PI. Then, the results obtained in Table 5 for the “Use of specific mixture of gases” are expected because, despite an important reduction is achieved in both populations, the proportion of high doses obtained resulted in a relatively important risk increase in the low-risk population, yielding a lower net reduction of the number of cases than in the high-risk population.

The reduction of t_{mH} by shortening the shelf-life has shown to be very important in reducing the number of cases (Table 5).

The application of microbiological criteria at primary production allowed the decrease of initial prevalence, as those “lots” (data sources from Table 1)

resulting in lower confidence than 95% for the value representing the 95% percentile in the microbiological criteria, were rejected. In this respect, it could be constructed a chart representing the number of units analyzed in a lot, the number of units testing positive, and the zone of the chart offering equal or greater confidence than the microbiological criterion.

Among the different RM measures, it seems that the most feasible, and, in fact, the one that is being employed as a common practice in the industrial sector, is the application of a mixture of gases at the factory. A model describing the effect of carbon dioxide and temperature on the growth of *L. monocytogenes* is desirable to properly assess the final risk. In this work, and regarding this measure, it was assumed a worst case of storage at 13°C and the composition of gases described in *Material and methods* section. Warton and Wills (2002), in their survey of storage conditions and quality of minimally processed packaged lettuce, found that the atmosphere inside the packages ranged between 0.8-12.3% O₂, 0.6-12.3% CO₂ and 0.16-1.36 ml/l ethylene. They concluded that greater uniformity in storage atmospheres would lead to more acceptable quality in packed salads. From a safety perspective, this uniformity would also permit a defined and uniform growth of *L. monocytogenes*.

Foodborne illnesses bring costs, as well as the implementation of RM measures to reduce those illnesses. Todd and Roberts (1996) listed the issues which need consideration for estimating the costs of foodborne illnesses. It is a matter of the competent authorities to balance them and make decisions. If this is to be systematically applied, costs of both illness and RM measure must be estimated.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Junta de Andalucía and the MEC project AGL 2005-119. Dr. Yvan LeMarc (IFR, Norwich, UK) is gratefully acknowledged for his assistance.

Appendix. Detailed model.

Table A1. Initial concentration and prevalence of *L. monocytogenes* in raw produce

Variable	Description (units)	Distribution/Model	Source
^a Prev ₀	Prevalence of contaminated heads of lettuce (unit fraction)	Cumulative(0.01; 0.5; {0.016;0.018;0.023;0.036;0.07;0.078;0.106;0.227}; {0.1;0.2;0.3;0.5;0.6;0.7;0.8;0.9})	Cumulative distribution from data tabulated in Table 1
N _{r-25g}	Concentration of <i>L. monocytogenes</i> in raw produce (log ₁₀ cfu/25g)	Cumulative(0; 5.39; {0.4;1.4;2.4;3.4;4.4}; {0.773;0.818;0.864;0.955;1})	Cumulative distribution from data tabulated in Table 2

^a50 uncertainty realizations of the variable were performed

Table A2. Manufacture of RTE salads at the factory

Variable	Description (units)	Distribution/Model	Source
R	Log ₁₀ reduction of the concentration of <i>L. monocytogenes</i> on produce by washing with chlorine (log ₁₀ cfu/25g)	Normal(1.96; 0.35; Truncate(1; 3))	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Brackett (1987) ▪ Zhang and Farber (1996)
N _{w-25g}	Concentration of <i>L. monocytogenes</i> in washed produce (log ₁₀ cfu/25g)	N _{w-25g} = N _{r-25g} - R	-
N _{w-g}	Concentration of <i>L. monocytogenes</i> in washed produce (log ₁₀ cfu/g)	N _{w-g} = log ₁₀ (10 ^{N_{w-25g}}) / 25 ↓ Fit of distributions to N _{w-g} ≥ 0 BetaGeneral(1.045; 2.6407; 0.0010267; 1.8458)	-
^a X _{r-L}	Number of contaminated grams of raw product in a lot	=Prev ₀ × ^b 250 × ^c 100	-
^a X _{w-L}	Number of contaminated grams of washed product in a lot	X _{w-L} = (1-P(N _{w-g} <0)) × X _{r-L}	-
^a Grams 1g, 2g, 3g-L _L	Grams of contaminated pieces of lettuce in a lot of 1g, 2g and 3g, respectively, after washing	Grams 1g-L _L = X _{w-L} / 3 Grams 2g-L _L = X _{w-L} / 3×2 Grams 3g-L _L = X _{w-L} / 3×3	-
^a 1g, 2g, 3g-L _{pack}	Number of 1g, 2g and 3g-contaminated pieces of lettuce, respectively, in a package	1g-L _{pack} = Binomial(67; 1g-L _L / (100,000/3)) 2g-L _{pack} = Binomial(33; 2g-L _L / (100,000/3×2)) 3g-L _{pack} = Binomial(22; 3g-L _L / (100,000/3×3))	-

Table A2. Manufacture of RTE salads at the factory. (Continued).

Variable	Description (units)	Distribution/Model	Source
^a X_{pack}	Number of contaminated grams of product in a package	$X_{\text{pack}} = (1g - L_{\text{pack}} + (2g - L_{\text{pack}} \times 2) + (3g - L_{\text{pack}} \times 3))$	-

^a50 uncertainty realizations of the variable.

^bAssumption: 250 heads of lettuce in a lot.

^cAssumption: only the external part of the head of lettuce is contaminated, i.e., 100 g.

^dAssumption: a lot contains 100,000 g of lettuce (250 heads of lettuce multiplied by 400 g each).

Table A3. Storage at retail/foodservice – Transportation – Storage at home

Variable	Description (units)	Description (units)	Source
Temp _R	Storage temperature at retail/foodservice (°C)	Cumulative(-2; 20; {0;1.6;3.3;5.6;8.3;10;11.6;13.3;15;16.6;18.3}; {0.059;0.109;0.258;0.526;0.734;0.833;0.932;0.962;0.982;0.990;0.998;	Audits International (2000)
time _R	Storage time at retail/foodservice (h)	Triangular(1; Uniform(2; 9); 37)	Audits International (2000)
Temp _T	Mean change in temperature during transportation from store to home (°C)	${}^a\text{Temp}_T = (-1.318 * (\text{time}_T^2)) + (5.8701 * \text{time}_T)$ R ² = 0.97	Audits International (2000)
time _T	Transportation time from store to home (h)	Triangular(0; 1; 2.5)	Audits International (2000)
Temp _H	Storage temperature at home (°C)	Normal(6.78; 2.56; Truncate(1; 11.3)	U.S.D.A (2003)
time _H	Storage time at home (h)	Triang(12; Uniform(72; 96); Uniform(192; 288))	Carrasco et al. (2007b)

^aQuadratic equation built from data provided by Audits International (2000).

Table A4. Population characteristics

Variable	Description (units)	Distribution/Model	Source
P_c	Percentage of population that purchases and consumes RTE salads lettuce-based (%)	$\text{Beta}(75.7+1; 100-75.7+1)$	Carrasco et al. (2007b).
SS	Serving size (g)	$\text{Cumulative}(25; 200; \{28; 55; 123\}; \{0.5; 0.75; 0.95\})$	U.S. Department of Agriculture (2003)
S_i	Number of servings consumed per individual and year	$\text{Weibull}(0.88139; 41.082; \text{RiskShift}(3.0003))$	Carrasco et al. (2007b)
$S_{\text{cont};i}$	Number of contaminated servings consumed per individual and year with a consumption profile i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ servings per year)	$S_{\text{cont};i} = \text{Binomial}(S_i; \text{Prev}_{\text{Pack}})$	-
Pop	Spanish population size (either low-risk or high-risk)	-	-
Consi	Number of consumers of RTE salads in Spain with a consumption profile i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ servings per year)	$\text{Consi} = \text{Pop} \times P(S_i) \times P_c$	-
$S_{\text{cont-Pop};i}$	Number of contaminated servings consumed by the Spanish population in a year with a consumption profile i ($i = 1, 2, 3, \dots, 235$ servings per year).	$S_{\text{cont-Pop};i} = S_{\text{cont};i} \times \text{Consi}$	-
$S_{\text{cont-Pop}}$	Number of contaminated servings consumed by the Spanish population in a year.	$S_{\text{cont-Pop}} = \sum_{i=1}^{235} S_{\text{cont-Pop};i}$	-

Table A5. Hazard and risk characterization

Variable	Description (units)	Distribution/Model	Source
PI	Probability of illness per contaminated serving	$^aPI=1-[1+(D^b)/\beta]^{-\alpha}$ (W-G model)	Farber et al. (1996)
PI_{approx}	Normal approximation to PI	Normal($^b\mu$; $^c\sigma/\sqrt{S_{cont-Pop}}$)	Vose (2000)
Number of cases	Number of cases of listeriosis in low-risk/high-risk population	Normal approximation of the binomial distribution: ($S_{cont-Pop}$; PI_{approx})= Normal($S_{cont-Pop} \times PI_{approx}$; $\sqrt{(S_{cont-Pop} \times PI_{approx} \times (1-PI_{approx}))}$)	Vose (2000)

^aParameters described in *Material and methods* section.

^bMedian of PI.

^cStandard deviation of PI.

Table A6. Management option: Sampling plan at primary production.

Variable	Description (units)	Distribution/Model	Source
$UPre_{V_{n10}}$	Uncertainty of the prevalence of a lot which fulfils a microbiological criterion $n=10$ $c=0$, absence in 25 g	$UPre_{V_{n10}} = \text{Beta}(0+1; 10-0+1)$	-
$UPre_{V_{n20}}$	Uncertainty of the prevalence of a lot which fulfils a microbiological criterion $n=20$ $c=0$, absence in 25g	$UPre_{V_{n20}} = \text{Beta}(0+1; 20-0+1)$	-
$UPre_{V_{n30}}$	Uncertainty of the prevalence of a lot which fulfils a microbiological criterion $n=20$ $c=0$, absence in 25g	$UPre_{V_{n20}} = \text{Beta}(0+1; 20-0+1)$	-
$UPre_{V_{source}}$	Uncertainty of the prevalence found by the corresponding source:	<p>Beta(1+1; 63-1+1)</p> <p>Beta(2+1; 108-2+1)</p> <p>Beta(6+1; 263-6+1)</p> <p>Beta(1+1; 28-1+1)</p> <p>Beta(332+1; 9223-332+1)</p> <p>Beta(3+1; 43-3+1)</p> <p>Beta(8+1; 103-8+1)</p> <p>Beta(7+1; 66-7+1)</p> <p>Beta(5+1; 22-5+1)</p>	<p>^aLin et al. (1996)</p> <p>^bVelani et al. (1991)</p> <p>^cBreer et al. (1992)</p> <p>^dTang et al. (1994)</p> <p>^eU.S.D.A. (2003)</p> <p>^fLegnani et al. (2004)</p> <p>^gDe Simón et al. (1992)</p> <p>^hHarvey et al. (1993)</p> <p>Arumugaswamy et al. (1994)</p>

Table A6. Management option: Sampling plan at primary production. (Continued).

Variable	Description (units)	Distribution/Model	Source
Prev-M _{n10}	Prevalence defined by various sources whose 95% confidences are equal or greater than the 95% confidence of UP _{Prev_{n10}} for the same value	ⁱ Cumulative(0.00000103; 0.576; {0.016;0.018;0.023;0.036;0.069;0.078;0.106}; {0.11;0.22;0.33;0.55;0.66;0.77;0.88})	Data from ^{a,b,c,d,e,f,g,h} sources in this Table
Prev-M _{n20}	Prevalence defined by various sources whose 95% confidences are equal or greater than the 95% confidence of UP _{Prev_{n20}} for the same value	ⁱ Cumulative(0.00000125; 0.366; {0.016;0.018;0.023;0.036}; {0.2;0.4;0.6;0.8};)	Data from ^{a,b,c,e} sources in this Table
Prev-M _{n30}	Prevalence defined by various sources whose 95% confidences are equal or greater than the 95% confidence of UP _{Prev_{n30}} for the same value	ⁱ Cumulative(0.00000213; 0.301; {0.016;0.018;0.023;0.036}; {0.2;0.4;0.6;0.8})	Data from ^{a,b,c,e} sources in this Table

^{a,b,c,d,e,f,g,h}Source references used to build the probability distribution of Manag_{n10}.

^{a,b,c,e}Source references used to build the probability distributions of Manag_{n20} and Manag_{n30}.

ⁱMinimum and maximum values of the cumulative distributions Manag_{n10}, Manag_{n20} and Manag_{n30} are the minimum and maximum values of the simulated distribution UP_{Prev_{n10}}, UP_{Prev_{n20}} and UP_{Prev_{n30}}, respectively (10,000 iterations).

REFERENCES

- Arnold, G.J., Coble, J., 1995. Incidence of *Listeria* Species in Foods in Nsw. Food Australia 47, 71-75.
- Arumugaswamy, R.K., Ali, G.R.R., Hamid, S.N.B.A., 1994. Prevalence of *Listeria Monocytogenes* in Foods in Malaysia. International Journal of Food Microbiology 23, 117-121.
- Audits International, 2000. 1999 U.S. Food temperature evaluation. Design and summary pages. Audits International and U.S. Food and Drug Administration.
- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., Salmaso, S., 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. The New England Journal of Medicine 342, 1236-1241.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M.H., Griffiths, M.W., Cerf, O., 1998. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. Preventive Veterinary Medicine 37, 129-145.
- Bennik, M.H.J., Peppelenbos, H.W., Nguyen-The, C., Carlin, F., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., 1996. Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. Postharvest Biology and Technology 9, 209-221.
- Bille, J., 1990. Emidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In: Miller, A.J., Smith, J.L., Somkuti, G.A. (Eds.), Foodborne listeriosis. Elsevier, Amsterdam, pp. 71-74.
- Brackett, R.E., 1987. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 50, 999-1003.
- Breer, C., Baumgartner, A., 1992. Occurrence and behavior of *Listeria monocytogenes* on salads, vegetables, and in fresh vegetable juices. Archiv fur Lebensmittelhygiene 43, 108-110.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G., Whiting, R.C., 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 52, 844-851.
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., 2007a. Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. Food Control. In press.

- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., 2007b. Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for listeriosis. *Journal of Food Protection*. In press.
- Codex Alimentarius, 1999. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. CAC/GL-30. Accessed at: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf.
- De Simón, M., Ferrer, M.D., 1998. Initial numbers, serovars and phagevars of *Listeria monocytogenes* isolated in prepared foods in the city of Barcelona (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 44, 141-144.
- De Simón, M., Tarragó, C., Ferrer, M.D., 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 16, 153-156.
- EFSA (European Safety Authority), 2004. Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in Spain in 2004. Accessed at: http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/1290.html.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2006. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal* 94.
- Fain, A.R., 1996. A review of the microbiological safety of fresh salads. *Dairy Food and Environmental Sanitation* 16, 146-149.
- FAO/WHO, 2003. Hazard characterization for pathogens in food and water. Guidelines. *Microbial Risk Assessment*, N° 4.
- FAO/WHO, 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods – Technical report. *Microbial Risk Assessment Series* 4. Accessed at: http://www.fao.org/ag/agn/jemra/listeria_en.stm.
- FAO/WHO, 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 April 2006. Kiel, Germany.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55, 476-511.

- Farber, J.M., Ross, W.H., Harwig, J., 1996. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology* 30, 145-156.
- Flores, J., Andreu E., Martínez M.C., Carrillo J.A., Nombela A., Periago M.J., and Ros G., 2004. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en la industria de vegetales congelados. Dificultad de propuesta de estrategias para su reducción. Conference Proceeding. XIV Congreso de microbiología de los alimentos, 19-22 September, Girona, España, p. 101.
- Francis, G.A., O'Beirne, D., 1998. Effects of storage atmosphere on *Listeria monocytogenes* and competing microflora using a surface model system. *International Journal of Food Science and Technology* 33, 465-476.
- Francis, G.A., Thomas, C., O'Beirne, D., 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 34, 1-22.
- García-Gimeno, R.M., Zurera-Cosano, G., Amaro-López, M., 1996. Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetable salads in Spain. *Journal of Food Safety* 16, 75-86.
- Genigeorgis, C.A., Oanca, P., Dutulescu, D., 1990. Prevalence of *Listeria* spp in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. *Journal of Food Protection* 53, 282-288.
- Gombas, D.E., Chen, Y.H., Clavero, R.S., Scott, V.N., 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection* 66, 559-569.
- Goulet, V., Jacquet, C., Vaillant, V., Rebiere, I., Mouret, E., Lorente, C., Maillot, E., Stainer, F., Rocourt, J., 1995. Listeriosis from consumption of raw milk cheese. *Lancet* 345, 1581-1582.
- Gudbjornsdottir, B., Suihko, M.L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjoberg, A.M., Niclasen, O., Bredholt, S., 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology* 21, 217-225.
- Guerra, M.M., McLauchlin, J., Bernardo, F.A., 2001. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology* 18, 423-429.

- Gunasena, D.K., Kodikara, C.P., Ganepola, K., Widanapathirana, S., 1995. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Sri Lanka. Journal of the National Science Council of Sri Lanka 23, 107-114.
- Harvey, J., Gilmour, A., 1993. Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern-Ireland. International Journal of Food Microbiology 19, 193-205.
- Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, P., Fraser, D.W., 1986. An outbreak of type-4B *Listeria monocytogenes* infection involving patients from 8 Boston hospitals. Archives of Internal Medicine 146, 520-524.
- Holcomb, D.L., Smith, M.A., Ware, G.O., Hung, Y.C., Brackett, R.E., Doyle, M.P., 1999. Comparison of six dose-response models for use with foodborne pathogens. Risk Analysis 19, 1091-1100.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA
- Jeong, D.K., Frank, J.F., 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 °C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. Journal of Food Protection 57, 576-586.
- Koseki, S., Isobe, S., 2005a. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. International Journal of Food Microbiology 104, 239-248.
- Koseki, S., Isobe, S., 2005b. Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. International Journal of Food Microbiology 101, 217-225.
- Legnani, P., Leoni, E., Berveglieri, M., Mirolo, G., Alvaro, N., 2004. Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. Food Control 15, 205-211.
- Lin, C.M., Fernando, S.Y., Wei, C.I., 1996. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetable salads. Food Control 7, 135-140.
- Lindqvist, R., Westöö, A., 2000. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. International Journal of Food Microbiology 58, 181-196.

- Lobo, G., González, M., 2006. Estado actual de los productos mínimamente procesados en España. IV Encontro Nacional Sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortalizas y I Simposio Ibero-americano de Vegetais Frescos Cortados, 4 - 7 Abril 2006, Brasil.
- Loncarevic, S., Johannessen, G.S., Rorvik, L.M., 2005. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in Applied Microbiology* 41, 186-189.
- Lyytikäinen, O., Ruutu, P., Mikkola, J., Siitonen, A., Maijala, R., Hatakka, M., Autio, T., 1999. An outbreak of listeriosis due to *Listeria monocytogenes* serotype 3a from butter in Finland. *Eurosurveillance Weekly* 11, 1-2.
- McLauchlin, J., 1993. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. *Environmental Policy and Practice* 3, 201-214.
- McLauchlin, J., 1997. The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: A public health perspective. *Reviews in Medical Microbiology* 8, 1-14.
- McLauchlin, J., Gilbert, R.J., 1990. *Listeria* in food. Report from the PHLS Committee on *Listeria* and listeriosis. *PHLS Microbiology Digest* 7, 54-55.
- McLauchlin, J., Hall, S.M., Velani, S.K., Gilbert, R.J., 1991. Human listeriosis and pate - A possible association. *British Medical Journal* 303, 773-775.
- Miettinen, M.K., Palmu, L., Bjorkroth, K.J., Korkeala, H., 2001. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant, and retail level. *Journal of Food Protection* 64, 994-999.
- Nguyen-The, C., Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34, 371-401.
- Nørrung, B., Andersen, J.K., Schlundt, J., 1999. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology* 53, 195-203.
- Notermans, S., Hoornstra, E., 2000. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in fish products: some general principles, mechanism of infection and the use of performance standards to control human exposure. *International Journal of Food Microbiology* 62, 223-229.
- 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. Journal of Food Protection 70, 1137-1152.
- Ragaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F., Debevere, J., 2004. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. Food Quality and Preference 15, 259-270.
- Rocourt, J., 1994. *Listeria monocytogenes*, the state of the science. Dairy Food and Environmental Sanitation 14, 70-82.
- Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H., Schlundt, J., 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. Fems Immunology and Medical Microbiology 35, 263-267.
- Sagoo, S.K., Little, C.L., Mitchell, R.T., 2003. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: Effectiveness of food hygiene training of management. Journal of Food Protection 66, 1581-1586.
- Salamina, G., Donne, E.D., Niccolini, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., Fini, R., Maldini, M., Schuchat, A., Swaminathan, B., Bibb, W., Rocourt, J., Binkin, N., Salmaso, S., 1996. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiology and Infection 117, 429-436.
- Sapers, G.M., Gorny, J.R., Yousef, A.E., 2006. Microbiology of fruits and vegetables. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V., 1983. Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food. New England Journal of Medicine 308, 203-206.
- Sizmur, K., Walker, C.W., 1988. *Listeria* in prepacked salads. Lancet 1, 1167.
- Szabo, E.A., Scurrah, K.J., Burrows, J.M., 2000. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. Letters in Applied Microbiology 30, 456-460.
- Szabo, E.A., Simons, L., Coventry, M.J., Cole, M.B., 2003. Assessment of control measures to achieve a food safety objective of less than 100 CFU of *Listeria monocytogenes* per gram at the point of consumption for fresh pre-cut iceberg lettuce. Journal of Food Protection 66, 256-264.
- Tang, M.Y., Cheong, Y.M., Zainulidin, T., 1994. Incidence of *Listeria* spp. in vegetables in Kuala Lumpur. Medical Journal of Malasya 49, 217-222.

- Thevenot, D., ignette-Muller, M.L., Christieans, S., Vernozy-Rozand, C., 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology* 102, 85-94.
- Todd, E. C. D. and Roberts, T., 1996. Approaches to estimating the benefits and costs of foodborne disease control choices. WHO Consultation on Costs and Preharvest Treatment of Animals. June 8-10-1995. Washington, D.C.
- U.S.Department of Agriculture, 2003. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Accessed at: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.
- Velani, S., Roberts, D., 1991. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in prepacked salad mixes and individual salad ingredients. *PHLS Microbiol.Digest* 8, 21-22.
- Vitas, A.I., Aguado, V., Garcia-Jalon, I., 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 90, 349-356.
- Vose, D., 2000. Risk analysis. A quantitative guide. Second edition. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England, UK.
- Warton, M.A., Wills, R.B.H., 2002. Survey of storage conditions and quality of minimally processed packaged lettuce in supermarkets. *Food Australia* 54, 191-192.
- Zhang, S., Farber, J.M., 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology* 13, 311-321.

V. DISCUSIÓN

CAPÍTULO 8. APLICACIÓN DE MODELOS DE CRECIMIENTO EN ENSALADAS DE IV GAMA SEGÚN LA NORMATIVA VIGENTE

El Reglamento (CE) N° 2073/2005 ha promovido el interés por desarrollar una estrategia para asistir a la industria de alimentos listos para consumo (RTE) en la realización de una demostración matemática, como se expone en dicho Reglamento. Existen dos criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* aplicables para los *alimentos listos para consumo* (RTE) *que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales*: (i) <100 ufc/g y (ii) *ausencia en 25 g*. La selección del primero sólo es posible si el industrial es capaz de demostrar que no se excede este nivel (100 ufc/g) a lo largo de la vida comercial del producto. El Reglamento en cuestión propugna que, en primer lugar, dicha demostración debe basarse en las características físico-químicas del alimento y en la consulta de literatura científica, y si es necesario, en modelos cuantitativos y/o en experimentos de inoculación del patógeno en el alimento. Las características físico-químicas del alimento objeto de estudio, endivias de IV gama, permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*, y la literatura científica consultada también pone de manifiesto la proliferación de *L. monocytogenes* en dicho alimento. Por tanto, los modelos de crecimiento constituyen un recurso para evaluar el nivel al que puede crecer *L. monocytogenes* en el alimento, y concretamente, si excederá o no el nivel 100 ufc/g fijado por el citado Reglamento como primer criterio.

En el caso de las endivias de IV gama se emplearon dos modelos predictivos. En primer lugar, el modelo secundario propuesto por Pin y col. (2001), de tipo polinomial, predijo la tasa máxima específica de crecimiento en función de la temperatura y del nivel de CO₂. Este modelo, acoplado con la ecuación de crecimiento exponencial nos dio como resultado la concentración de *L. monocytogenes* (ufc/g) al final de la vida comercial. Se tuvieron en cuenta varios niveles de CO₂, una distribución de temperaturas de almacenamiento (Azevedo y col., 2005) y varias opciones de vida comercial. Asumiendo un nivel inicial del patógeno (justo al comienzo de la vida comercial) de 10 ufc/g (nivel de detección de la técnica de recuento de *L. monocytogenes* según el anterior Reglamento), el 78% de las 126 condiciones consideradas mostraron un percentil entre 0 y 5% correspondiente a 100 ufc/g. Con este resultado, parece muy difícil demostrar que no se excederá el límite de 100 ufc/g a lo largo de la vida comercial. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que el modelo predictivo se construyó a partir de datos de

crecimiento del patógeno en caldo de cultivo, lo que explicaría su carácter conservador. Posteriormente se validó el modelo con datos de crecimiento a 10°C en las endivias de IV gama. Los factores sesgo y exactitud fueron muy elevados, lo que ratifica la hipótesis conservadora que se sugirió anteriormente.

En segundo lugar, el modelo de Baranyi y Roberts (1994) ajustado a los datos de crecimiento en endivias de IV gama, se acopló también con la ecuación de crecimiento exponencial para predecir el nivel de *L. monocytogenes* al final de la vida comercial (varias opciones). Los resultados no fueron tan conservadores, habiendo 9 condiciones de 42 que mostraron una concentración final por debajo de 100 ufc/g. También en este caso se asumió un nivel inicial de 10 ufc/g. Se observó un mayor crecimiento del patógeno a niveles de CO₂ más elevadas, hecho que podría explicarse por la reducción de la flora aerobia competitiva en las endivias (Carlin y col., 1996a). Se puede concluir, pues, que un fabricante de endivias de IV gama que detecte *L. monocytogenes* en su producto, podría aplicar una de las 9 condiciones favorables (Figura 1 del capítulo 4), y no superar el límite de 100 ufc/g a lo largo de la vida comercial, acogiéndose al criterio microbiológico 100 ufc/g establecido por el Reglamento (CE) N° 2073/2005.

La concentración inicial empleada (10 ufc/g) es el nivel de detección de la técnica de recuento de *L. monocytogenes* (ISO 11290-2) para alimentos sólidos, según el citado Reglamento. La elección de este nivel se fundamentó en los datos de concentración de *L. monocytogenes* disponibles en la literatura, que demuestran que niveles ≤ 10 ufc/g son los que con más frecuencia se encuentran. Así, por ejemplo, Gombas y col. (2003) hallaron niveles ≤ 10 ufc/g en un 82% de las muestras vegetales positivas que analizaron (22 positivas de un total de 2.966 muestras analizadas).

Pero, ¿qué interés puede tener una empresa en acogerse al criterio microbiológico < 100 ufc/g? La respuesta se halla en las investigaciones sobre prevalencia de *L. monocytogenes* en vegetales crudos y procesados. Por ejemplo, el SCVPH (1999) publicó un rango de contaminación de vegetales y ensaladas entre el 1-12%, recopilando información de distintas fuentes a nivel europeo. Otros trabajos han informado sobre la prevalencia de *L. monocytogenes* en vegetales crudos y de IV gama (De Simón y col., 1992; Francis y col., 1999; García-Gimeno y col., 1996; Sizmur y Walker, 1988; Szabo, y col., 2000). Todo esto indica que la posibilidad de encontrar *L. monocytogenes* en ensaladas de IV gama es una realidad en las industrias que

fabrican de este tipo de productos, por lo que el interés del industrial, desde el punto de vista legislativo, es acogerse al criterio microbiológico más permisivo, es decir, *<100 ufc/g a lo largo de la vida comercial.*

8.1. ELECCIÓN DEL MODELO DE CRECIMIENTO

La obtención de un modelo de crecimiento secundario es siempre deseable para poder predecir la tasa de crecimiento (o muerte) en función de los factores físico-químicos que imperan en el alimento. Los modelos de crecimiento primarios predicen la tasa de crecimiento (y otros parámetros cinéticos) a unas condiciones fijas, por lo que su aplicación es más limitada, y por lo general restringida a predicciones en escenarios concretos, como es el caso de este trabajo (escenario de temperatura de abuso de 10°C). Sin embargo, la elaboración de un modelo secundario requiere una considerable cantidad de datos microbiológicos, siendo mayor cuantos más factores se consideren. Idealmente, los modelos de crecimiento secundarios deben ser específicos de productos o categorías de productos alimenticios, como indicaron Devlieghere y col. (2001) en un trabajo en el que elaboraron un modelo específico de tipo polinomial para productos cárnicos cocidos envasados en atmósfera modificada. Precisamente fue la disponibilidad de este modelo específico, la que impulsó la elaboración de un trabajo en el que se llevó a cabo la misma demostración que se presenta en esta Tesis, pero con jamón cocido (Carrasco y col., 2007c), como ejemplo de *alimento listo para consumo*.

En el capítulo 4, se seleccionaron dos modelos para la demostración presentada: un modelo secundario (Pin y col., 2001), y un modelo primario (Baranyi y Roberts, 1994) ajustado a datos de crecimiento en endivias de IV gama. Además, para estimar la concentración de *L. monocytogenes* al final de la vida comercial, se aplicó el modelo de crecimiento exponencial acoplado a los dos anteriores. Los resultados derivados de una u otra aproximación fueron muy distintos, siendo en el primer caso nada favorable, mientras que en el segundo, el 21,4% de las condiciones fueron favorables. De esta divergencia se deduce que se ha de tomar una decisión con respecto a la elección del modelo.

En distintos foros y conferencias se puede observar la sutil diferencia entre los intereses de la comunidad científica y los de la comunidad sanitaria, en el ámbito de la seguridad alimentaria. Si bien es un objetivo general y común la producción de alimentos sanos y seguros, la comunidad científica se inclina hacia la precisión y exactitud de los resultados, mientras que la autoridad sanitaria se rige por la seguridad alimentaria (los “márgenes de seguridad” son deseables) y la fiabilidad que ofrezcan los métodos empleados. Como ejemplo de la filosofía de la comunidad científica, Ratkowsky (2004)

profesaba la elaboración de modelos predictivos “buenos”, entendidos como aquellos que predicen de forma más exacta el crecimiento de un microorganismo en alimentos. Los demás modelos (con “desvío de seguridad” o “desvío de peligrosidad”) los califica como “malos”. Sin embargo, los modelos con “desvío de seguridad”, al sobrestimar la tasa de crecimiento de los microorganismos con respecto a su comportamiento en un alimento concreto, proporcionan un margen de seguridad. En el estudio que se presenta, el modelo secundario de Pin y col. (2001) es un modelo con “desvío de seguridad”, como así lo indicaron los valores de los factores sesgo y exactitud (4,36 y 4,74, respectivamente). Si las predicciones se ajustaran en un 100% a los datos de crecimiento en endivias, extraídos de ComBase predictor, tendrían que tener ambos un valor de 1. Un aumento con respecto a 1 de 0,10-0,15 para el factor exactitud, es considerado aceptable (Ross y col., 2000). El modelo secundario empleado posee 2 factores, CO₂ y temperatura, por lo que el valor 4,74 para el factor exactitud es conservador en demasía. Ratkowsky (2004) también sugirió que el uso de un modelo demasiado conservador podría incluso predecir crecimiento en condiciones muy limitantes, bajo las cuales sería imposible que hubiera crecimiento en el alimento. Además de esto, un enfoque tan conservador produciría el rechazo de alimentos que realmente son salubres, llevando, no sólo a una disminución de los beneficios del industrial, sino también a una menor disponibilidad de alimentos y posibilidad de elección por parte del consumidor. Y, por supuesto, los costes inherentes a la producción de alimentos “extremadamente” seguros pasarían al consumidor.

Por todo esto, el modelo primario de Baranyi y Roberts (1994) ajustado a los datos de crecimiento en endivias de IV gama, se considera más apropiado. De todas formas, como solución de compromiso entre el enfoque conservador (extremadamente seguro) y el enfoque de exactitud de las predicciones, se llevó a cabo la demostración con el modelo primario a una temperatura constante de 10°C, constituyendo esta temperatura el percentil 86,4% de la distribución de temperaturas de Azevedo y col. (2005). Como ejemplo de las diferencias entre los dos modelos (secundario y primario), se observa que la tasa de crecimiento predicha por el modelo primario a 10°C con una atmósfera del 50% de CO₂ (0,034 ln ufc/g), es la que predice el modelo secundario a una temperatura de 4,8°C.

8.2. CÁLCULO DEL NIVEL INICIAL DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

En este estudio, se hizo un ensayo matemático para calcular la concentración inicial (N_0) de *L. monocytogenes* que tendría que tener el producto (al principio de la vida comercial) partiendo de una concentración al final de la vida comercial (N_f) de 100 ufc/g (cálculo inverso), empleando el modelo de Pin y col. (2001). Se concluyó que este tipo de estudios no es recomendable por dos razones. En primer lugar, en muchos casos (82% de las condiciones), se obtuvo para el percentil 95% un nivel N_0 entre 0 y 1 ufc/g, que carece de sentido biológico cuando, a posteriori, se desea aplicar la ecuación de crecimiento exponencial para modelar el crecimiento durante la vida comercial (p. ej., 0,2 ufc/g no es una unidad biológica que pueda crecer exponencialmente). Lo que se hubiera deseado obtener es un valor ≥ 1 ufc/g para el percentil 0% (mínimo valor de las iteraciones) para las 126 condiciones estudiadas. La Figura 8.1 muestra el resultado N_0 para la condición 70% CO_2 – 4 días de vida comercial, y lo que se hubiera deseado obtener.

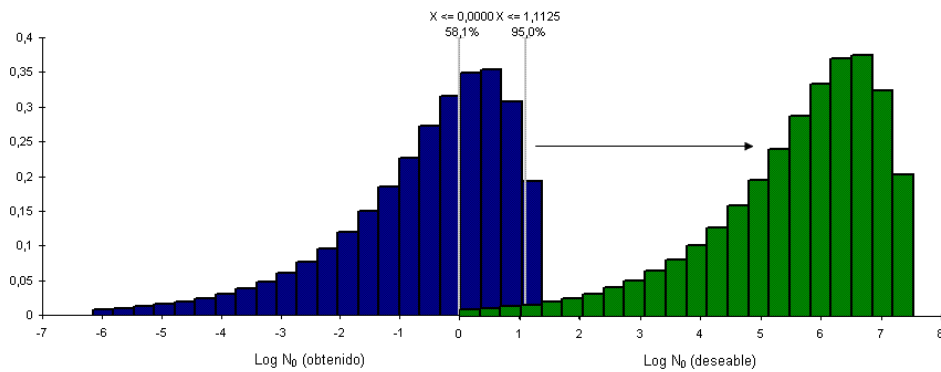


Figura 8.1. Resultado obtenido de la simulación de N_0 para la condición 70% CO_2 – 4 días de vida comercial (azul), y resultado deseable con sentido biológico (verde).

En segundo lugar, el valor correspondiente al 95% percentil de N_0 tuvo lugar al 5% percentil de temperatura (3,49°C). La gráfica de la Figura 8.2 pretende ilustrar esta idea. En la condición 70% CO_2 – 4 días de vida comercial, el 95% percentil para N_0 fue 13 ufc/g. Los valores entre el 95 y 100% percentil de N_0 (entre 13 y 25 ufc/g) tuvieron lugar a valores de temperatura entre 0% y 5% percentil. Ahora bien, si con estos valores de N_0 se modelara el crecimiento durante la vida comercial usando la distribución de temperaturas, cabría esperar en un gran porcentaje, valores de N_f mucho

mayores que 100 ufc/g, puesto que durante la simulación se muestrean valores de temperatura de toda la distribución, y no sólo del 0-5% percentil. Por ejem-

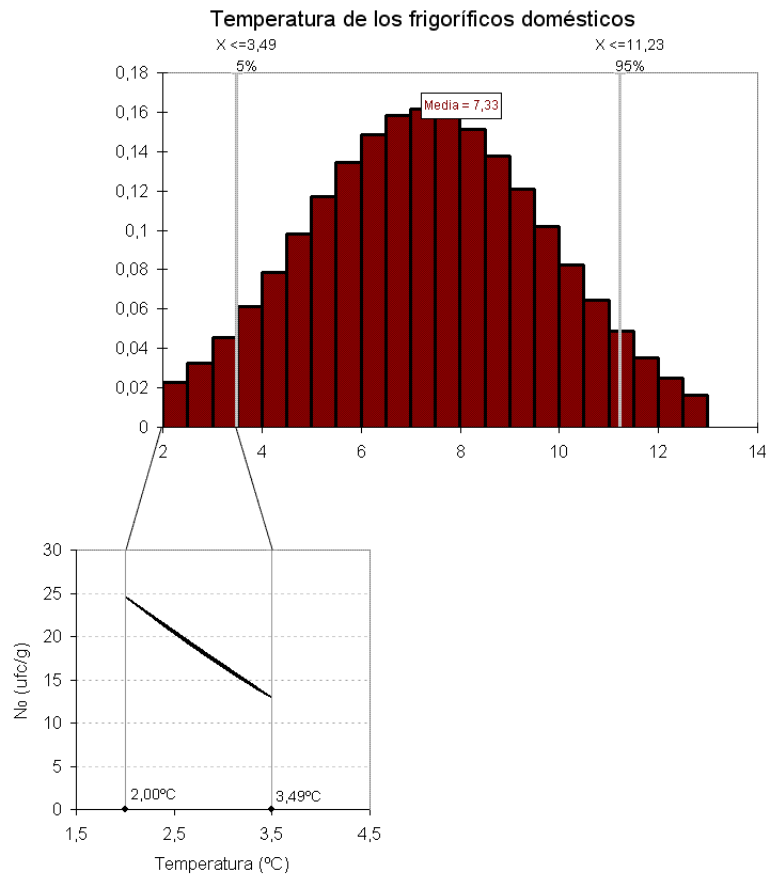


Figura 8.2. Correspondencia entre temperaturas y valores de N_0 simulados para la condición $70\% CO_2 - 4$ días de vida comercial.

plo, un valor N_0 de 13 ufc/g para la condición $70\% CO_2 - 4$ días de vida comercial daría lugar a los valores N_f mostrados en la Tabla 8.1 correspondientes a varios percentiles.

El cálculo inverso del nivel inicial de patógeno N_0 muestra ser, por tanto, impracticable, siendo más realista la selección de un nivel inicial de patógeno para calcular el nivel final que habría en el alimento objeto de estudio.

Tabla 8.1. Valores de N_f (ufc/g) correspondientes a varios percentiles para la condición *70% CO₂ – 4 días de vida comercial* partiendo de una concentración inicial $N_0 = 13$ ufc/g.

	Percentil (%)						
	0	5	25	50	75	95	100
N_f (ufc/g)	$5,3 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$	$4,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^9$

CAPÍTULO 9. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN DE LA POBLACIÓN A *LISTERIA MONOCYTOGENES*

La evaluación de la exposición es una de las cuatro etapas de las que consta la Evaluación del Riesgo (ER). Como se indicaba en el apartado 1.3.3. *Evaluación de la exposición*, el objetivo que se persigue en esta etapa es estimar (i) la frecuencia de la exposición de los consumidores al peligro presente en el alimento (ensaladas de IV gama, en este caso); (ii) la frecuencia de consumo del alimento en cuestión; y (iii) el nivel de contaminación del alimento en el momento de consumo.

El nivel de contaminación del alimento en el momento de consumo es, obviamente, imposible de conocer de forma directa. En general, se pueden establecer dos alternativas para subsanar este escollo: asumir en el momento del consumo la concentración del patógeno en alimento hallada en una fase anterior de la cadena “de la huerta a la mesa” (Lindqvist y Westöö, 2000); o bien, dando un paso más, modelar matemáticamente los cambios en concentración y prevalencia del patógeno desde la fase en la que se dispone de estos datos hasta el momento de consumo. En la presente tesis, se opta por la segunda vía.

En el capítulo 7, la Figura 3 representaba la cadena “de la huerta a la mesa” de las ensaladas de IV gama. En dicha Figura se puede apreciar que existe un proceso de reducción de concentración (y también de prevalencia) y un proceso de crecimiento del patógeno. La reducción tiene lugar debido a los procesos de lavado de los vegetales en la industria. El crecimiento ocurre durante las fases de almacenamiento y transporte refrigerado de las ensaladas. La literatura científica ofrece resultados dispares en cuanto al crecimiento de *L. monocytogenes* en ensaladas de IV gama, y a menudo, sólo hay disponibles recuentos microbianos después de varios días de almacenamiento, sin mostrar una serie de recuentos que obedezcan a una curva de crecimiento. Por otra parte, la atmósfera modificada que usualmente se aplica a las ensaladas de IV gama puede variar entre el empaquetado sin inyección inicial de gases (por lo que la atmósfera se modifica de forma pasiva a lo largo del almacenamiento) o con inyección inicial de gases (normalmente, una mezcla de CO₂, O₂ y N₂). Por todo esto, se decidió monitorizar el crecimiento de *L. monocytogenes* en ensaladas de IV gama en una atmósfera modificada típica (capítulo 5).

9.1. CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ENSALADAS DE IV GAMA

Se escogió como modelo de estudio la lechuga de IV gama, dada su extensa comercialización en España, constituyendo el 70% de la producción de hortalizas de IV gama en España (ver subcapítulo 3.3. *Estado actual de las ensaladas de IV gama en España*).

Las ensaladas de lechuga (variedad *Iceberg*) que se analizaron en este estudio presentaron la siguiente composición inicial de gases: 4,65-6,2% CO₂, 2,1-4,3% O₂ y balance de N₂. Esta composición está en consonancia con la composición recomendada por el Instituto de Tecnólogos de Alimentos (Institute of Food Technologists, 2001): 0,5-3% de O₂, 5-10% de CO₂ y balance de N₂ para todas las variedades de lechuga troceada, excepto para la lechuga *Butterhead*, para la que sugiere una concentración de O₂ =1-3% y para la lechuga *Iceberg*, un 5-10% de CO₂.

Se monitorizó el crecimiento de *L. monocytogenes* a 13°C, simulando una condición de abuso de temperatura y a 5°C, temperatura recomendada por el fabricante. A ambas temperaturas, el patógeno mostró un crecimiento moderado-lento en comparación con los resultados de otros autores, que estudiaron el crecimiento del patógeno en lechuga sin inyección inicial de gases. A 13°C, *L. monocytogenes* no presentó fase de adaptación, creciendo de inmediato a una tasa Gr = 0,019 log₁₀ ufc/h, para alcanzar aproximadamente en el día 13 de almacenamiento la fase estacionaria, presentando una densidad máxima de población de 7.40 log₁₀ ufc/g (incremento total de 4,85 unidades logarítmicas). A 5°C, la fase lag duró 5,6 días, para luego emprender el crecimiento con una Gr = 0,013 log₁₀ ufc/g (incremento total de 2,66 unidades logarítmicas). A 5°C no se alcanzó la densidad máxima de población durante el período experimental (14 días).

El experimento de inoculación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones dadas por Scott y col. (2005), como es proporcionar el inóculo en un estado representativo del producto estudiado o de las fuentes previsibles de contaminación. Así, el nivel del inóculo debe ser tan bajo como sea posible, pues la contaminación de los vegetales por *L. monocytogenes* suele ocurrir a niveles bajos. En este estudio se inoculó ≈100-1000 ufc/g. Además de esto, previo a la inoculación de las ensaladas, se cultivó el patógeno en medio de cultivo a 7°C, puesto que las lechugas, tras ser contaminadas muy posiblemente en el campo o en la planta de procesado, se almacenan en refrigeración antes de ser procesadas. La temperatura a la que

se somete un microorganismo previo a la inoculación, denominada usualmente como temperatura precultivo o de preincubación, ha mostrado tener una gran influencia en la fase de adaptación del patógeno durante el crecimiento posterior en alimento o en medio de cultivo. Francois y col. (2007) estudiaron el efecto de la temperatura de preincubación sobre la fase de adaptación de células individuales de *L. monocytogenes* cultivadas posteriormente a 7°C. Concluyeron que, a menor temperatura de preincubación, la fase de adaptación fue más corta, presentando además menos variabilidad entre réplicas.

Se evaluó también la capacidad predictiva del modelo de ComBase predictor (<http://wyndmoor.arserrc.gov/combase/>) tomando los puntos (tiempo-concentración) y representándolos junto con los resultados obtenidos en este estudio. Se observó claramente que fue a 5°C cuando ComBase predictor dio mejores predicciones. Esto podría explicarse por la mejor capacidad predictiva de ComBase predictor (y quizás, cualquier modelo predictivo basado en experimentos en caldo de cultivo) en matrices de alimento expuestas a condiciones limitantes para el crecimiento. También se calcularon las tasas de crecimiento de otros modelos predictivos, siendo el modelo de Koseki e Isobe (2005a) el que más se acercó a las tasas halladas en este estudio.

Los grupos de bacterias ácido lácticas (BAL) y de psicrotrofos crecieron a la misma velocidad a igual temperatura, alcanzando mayor densidad de población a 13°C que a 5°C, y sin presencia de fase de adaptación en ningún caso. Francis y O'Beirne (1998) hallaron que, entre la flora microbiana predominante en lechuga de IV gama, *Pseudomonas* spp. no afectó el crecimiento de *L. innocua* (emplearon en sus experimentos *L. innocua* en lugar de *L. monocytogenes*), mientras que las BAL y enterobacterias disminuyeron el crecimiento del patógeno.

De este estudio, y mediante comparación con otros trabajos (Steinbruegge y col., 1988; García-Gimeno y Zurera-Cosano, 1997; Szabo y col., 2003; Koseki e Isobe, 2005b) se puede deducir que a 13°C *L. monocytogenes* fue capaz de alcanzar mayor densidad de población en lechuga envasada en atmósfera modificada con inyección de gases (presente estudio) que en lechuga envasada sin inyección inicial de gases (otros estudios). Sin embargo, la tasa de crecimiento se vio disminuida. La no existencia de fase lag podría explicarse por la adaptación del inóculo a bajas temperaturas (7°C). A 5°C, se puede concluir lo mismo con referencia a la densidad máxima de población y

a la tasa de crecimiento, aunque no para la fase de adaptación, donde se observó una duración mayor. La mayor densidad máxima de población alcanzada en este estudio puede explicarse por el efecto “Jameson” (Stephens y col., 1997), que establece que cuando se ha alcanzado en un alimento la densidad máxima microbiana característica del mismo, se detiene el crecimiento de todos los microorganismos. Así, es posible que la atmósfera gaseosa pobre en O₂ frenara el crecimiento de la flora aerobia competitiva, retrasando así que se alcance la densidad máxima microbiana, y permitiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta niveles que, sin esta atmósfera modificada, no los alcanzaría.

Se pone de relevancia la importancia de la atmósfera modificada con inyección de gases para retrasar el crecimiento de *L. monocytogenes*. Esto es particularmente útil si se tiene en cuenta que la temperatura indicada por el fabricante (5°C) no es la temperatura real que opera en los frigoríficos domésticos ni en las vitrinas refrigeradas de los supermercados (Audits International, 2000; Warton y Wills, 2002; Azevedo y col., 2005). Por tanto, la selección de gases es crucial para mantener la seguridad de la lechuga de IV gama, como se ha demostrado a una temperatura de abuso (13°C).

9.2. RECOPIACIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

Como se indicaba al principio de este apartado 2, en la evaluación de la exposición se pretendía estimar la frecuencia de la exposición de los consumidores al peligro presente en el alimento (ensaladas de IV gama, en este caso), la frecuencia de consumo del alimento y la concentración del patógeno en el momento de consumo (esto último tratado en el subapartado anterior).

El trabajo presentado en el capítulo 6 es una encuesta en la que, en una primera parte, se recopilaron datos sobre los hábitos de consumo de las ensaladas de IV gama, dando así resupuesta a los dos primeros requerimientos mencionados anteriormente. En una segunda parte, se monitorizó la temperatura de 30 frigoríficos domésticos durante 24 horas, pues, pese a que se dispone de datos sobre la temperatura de los frigoríficos en otros países, se consideró importante disponer de una base de datos propia, en España, para su aplicación en la presente tesis y en futuros estudios en la población española.

La encuesta reveló que el consumo de ensaladas de IV gama es aún moderado. Si bien buena parte de la población (75,7%) afirma haber consumido este tipo de ensaladas, sólo el 24,68% de éstos la consumen con media-alta frecuencia (7,4% *más de 2 veces por semana* y 17,28% *una o dos veces a la semana*); el 29,63% la consumen *una o dos veces al mes*, y el 45,68%, *ocasionalmente*. Comparativamente, en otros países como Bélgica, el consumo es mucho mayor, consumiendo con una frecuencia de *una vez a la semana* el 57,1% de la población, *una vez al mes* el 35,4%, y tan sólo el 7,5% consume *menos de una vez al mes* (Ragaert y col., 2004).

Las principales ventajas que los encuestados atribuyeron al consumo de ensaladas de IV gama es el *ahorro de tiempo* y la *comodidad*. Estas ventajas están en consonancia con los intereses de los nuevos modelos familiares de la sociedad moderna. Los adultos independientes y las parejas de adultos sin hijos, son los modelos familiares que han experimentado mayor aumento en España entre el 2004 y el 2005, siendo del 11,2 y 8,3%, respectivamente (subcapítulo 3.3. *Estado actual de las ensaladas de IV gama en España*).

Por otra parte, se detectó que un 9,9% de los consumidores de las ensaladas de IV gama (mayormente, con edades comprendidas entre 20 y 35 años) no siempre respeta la fecha de caducidad. Este hecho podría suponer un riesgo potencial de listeriosis si se fijaran fechas de caducidad basadas en el

crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto, como sugiere Ransom (2005), quien propone que *L. monocytogenes*, por ser un microorganismo psicrotrofo capaz de crecer en multitud de alimentos RTE, debería ser evaluado en cuanto a su capacidad de crecimiento para establecer la fecha caducidad de los alimentos RTE. Por tanto, conocer el crecimiento de *L. monocytogenes* en las ensaladas de IV gama, no sólo tiene su utilidad en la demostración por parte de los industriales que se exponía en el apartado 1, sino también en la fijación de la fecha de caducidad.

En cuanto a las temperaturas de los frigoríficos domésticos, se encontró que la variabilidad de la media de temperaturas sigue una distribución Normal (6,62; 2,56), mientras que la variabilidad de la varianza fue descrita por la distribución Gamma (2,00; 1,00). Como era de esperar, los cambios de temperatura más importantes observados a lo largo de 24 h, se corresponden con los tiempos de día y de noche. Se evidencia, pues, el difícil control de la temperatura de los frigoríficos debido a las entradas de calor en las horas diurnas. Comparativamente, se puede observar que en países mediterráneos como España y Portugal, los frigoríficos domésticos operan a mayores temperaturas que en países nórdicos como Holanda o Reino Unido, o en Estados Unidos. La Tabla 1 del capítulo 6 muestra estas diferencias. Por tanto, desde un punto de vista de seguridad, aquellos alimentos que permitan el crecimiento de patógenos en condiciones de refrigeración, presentarán más riesgo en países mediterráneos.

Los resultados de los hábitos de consumo de ensaladas de IV gama se han empleado en esta tesis para la Evaluación y Gestión del Riesgo de listeriosis (capítulo 7). Sin embargo, se puntualiza que estos datos son igualmente válidos para evaluar y gestionar el riesgo de la presencia de otro patógeno que pueda ser vehiculado por estas ensaladas, y que han mostrado ser un peligro potencial, como es el caso de *Escherichia coli* O157:H7 (Hillborn y col., 1999; Wachtel y col., 2002a) (<http://www.cdc.gov/ecoli/2006/december/121406.htm>), *Shigella sonnei*, (Davis y col., 1988; Johnsen y col., 1995), *Clostridium boulinum* (A) (Solomon y col., 1990) o el virus de la hepatitis A (Rosenblum y col., 1990).

CAPÍTULO 10. ANÁLISIS DEL RIESGO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ENSALADAS DE IV GAMA

El Análisis de Riesgos se ha configurado como la base de la legislación alimentaria en Europa, según el Reglamento (CE) N° 178/2002. Aunque hasta ahora se ha venido haciendo con carácter cualitativo, actualmente, con el desarrollo de modelos dosis – respuesta para patógenos, la posibilidad de modelar el crecimiento, muerte y transferencia microbiana, la disponibilidad de hardware y software cada vez más potentes, y el avance en las comunicaciones, se ha impulsado el Análisis de Riesgos de forma cuantitativa y con base científica. En el capítulo 7 se presenta la Evaluación (ER) y Gestión del Riesgo de listeriosis por consumo de ensaladas de IV gama en España.

10.1. EVALUACIÓN DEL RIESGO E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES IMPLICADOS

La ER se ha llevado a cabo siguiendo las pautas del Codex Alimentarius (1999), configurándose como de tipo cuantitativo y estocástica (QMRA), de forma que las variables consideradas en el modelo QMRA se describieron mediante distribuciones de probabilidad, entendida esta como incertidumbre en algunos casos, y variabilidad en otros. De las cuatro etapas de las que consta la ER, la evaluación de la exposición fue la más desarrollada, pues se modelaron las fases que se suceden en la cadena “de la huerta a la mesa” (Figura 3 del capítulo 7). En las fases en las que se modeló el crecimiento de *L. monocytogenes*, es decir, durante el transporte y el almacenamiento refrigerado hasta el momento del consumo, se empleó un modelo predictivo secundario elaborado por Koseki e Isobe (2005a) (Ecuación 1 del capítulo 7). Este modelo es específico para lechuga envasada sin inyección inicial de gases. Como se ha mencionado en el apartado 1.1 de la discusión, el empleo de un modelo secundario es preferible, puesto que se puede calcular la tasa de crecimiento del patógeno bajo distintas condiciones, en este caso, de temperatura. Así pues, los resultados expuestos en el capítulo 5 (modelo primario ajustado a datos de crecimiento) se emplearon en la Gestión del Riesgo, que se verá más adelante. Sí que se empleó en esta etapa de evaluación de la exposición los resultados obtenidos en el capítulo 6. En la etapa de caracterización del peligro se optó por el modelo dosis-respuesta Weibull-Gamma (W-G), propuesto por Farber y col. (1996).

Como resultado del modelo QMRA, se obtuvieron un número de casos que varió entre 2×10^1 - 9×10^2 casos/año para la población de bajo riesgo, y 6×10^4 - 3×10^6 al año para la población de alto riesgo para 50 escenarios de prevalencia en bolsas de ensalada ($Prev_{pack}$) (Figura 7 del capítulo 7). El cálculo del número de casos fue resultado de una aproximación normal al proceso binomial que caracteriza el consumo de un número determinado de raciones contaminadas al año por la población española ($S_{cont-Pop}$) y la aproximación normal de la probabilidad de enfermar por persona y ración contaminada (PI_{aprox}) (Figura 1 del capítulo 7). En el cálculo de esta última aproximación, PI_{aprox} , en la forma indicada por Vose (2000), las medias y desviaciones estándar de PI que se emplearon fueron $2,45 \times 10^{-6}$ - $2,63 \times 10^{-6}$ y $9,01 \times 10^{-6}$ - $9,28 \times 10^{-6}$, respectivamente, para la población de bajo riesgo, y $2,40 \times 10^{-2}$ - $2,60 \times 10^{-2}$ y $6,10 \times 10^{-2}$ - $6,30 \times 10^{-2}$, respectivamente, para la población de alto riesgo. El hecho de que haya rangos para las medias y desviaciones estándar de PI tiene su origen en el modelado del lavado y cortado de la lechuga en la industria (Figura 4 del capítulo 7), que hizo que en cada uno de los 50 escenarios de prevalencia inicial ($Prev_0$) la concentración (N_{pack}) y la prevalencia ($Prev_{pack}$) en las bolsas de ensalada fueran distintos. Así, puesto que la concentración del patógeno en las bolsas en el momento del consumo, $N_{pack-con}$, que procede de N_{pack} , es un input del modelo dosis-respuesta (Ecuación 5 del capítulo 7), el resultado del modelo, PI, varió con N_{pack} .

Como se puede observar, la diferencia en el número de casos entre las poblaciones de bajo y alto riesgo fue de 3,5 unidades logarítmicas. Bemrah y col. (1998) observaron ≈ 1 unidad logarítmica de diferencia en el número de casos entre la población de bajo y alto riesgo. Sin embargo, Lindqvist y Westöö (2000) encontraron que el orden de magnitud en el número de casos era el mismo para ambos tipos de población. Esto podría explicarse por la distribución de dosis que obtuvieron, de hasta $8 \log_{10}$ ufc/ración, y la situación de estas dosis altas en el extremo derecho del eje de abcisas del modelo W-G (Figura 10.1.b) (Farber y col., 1996b).

En España, el número de casos de listeriosis anuales en los años 2001-2005 fueron 57, 49, 52, 100 and 67 (EFSA, 2006a), números muy por debajo de los predichos por nuestro modelo QMRA. Sin embargo, hay tres hechos fundamentales que pueden explicar esta diferencia. En primer lugar, los modelos dosis-respuesta disponibles poseen mucha variación, y los resultados derivados de su uso, más que proporcionar un valor en sí mismos, constituyen el parámetro de comparación entre distintas medidas de gestión (Notermans y

Hoorstra, 2000). En segundo lugar, se ha de tener en cuenta que el modelo de crecimiento empleado (Koseki e Isobe, 2005a) está basado en experimentos de inoculación de *L. monocytogenes* en lechuga de IV gama envasada sin inyección inicial de gases. Esto es una limitación, puesto que parece ser que el denominador común de las ensaladas de IV gama es el empleo de mezclas de gases. Como se vio en el capítulo 5, el crecimiento de *L. monocytogenes* en lechuga de IV gama envasada con una composición determinada de gases, fue muy lento en comparación con el trabajo de Koseki e Isobe (2005b), sin inyección inicial de gases. Lo ideal es disponer de un modelo de crecimiento secundario específico para ensaladas de IV gama y que contemple la temperatura y el CO₂, herramienta de la que no se dispone por el momento. Por último, se deseó saber cuál sería el número de casos si el criterio de ≤ 100 ufc/g (a lo largo de la vida comercial) establecido por el Reglamento (CE) N° 2073/2005 se cumpliera. Para ello, se seleccionaron aquellos valores de $N_{\text{pack-cons}} \leq 4.30 \log_{10}$ ufc/bolsa (equivalente a $2 \log_{10}$ ufc/g) en el escenario del valor mediana de $PreV_{\text{pack}}$, dando como resultado una disminución de PI de ≈ 3 unidades logarítmicas, y, como consecuencia, un número de casos situado en 0 y 244 casos/año para la población de bajo y alto riesgo, respectivamente (reducciones de 3,2 y 2,9 unidades logarítmicas con respecto al modelo base). Estos valores están en consonancia con los casos/año que se vienen observando en España desde el 2001. Y, aunque los casos de listeriosis en España pueden deberse a otras fuentes además de las ensaladas de IV gama (p. ej., quesos de leche cruda, salmón ahumado o carnes poco hechas), también se ha de tener en cuenta que existen casos de listeriosis no detectados. Lindqvist y Westö (2000), aplicando el mismo supuesto de ≤ 100 ufc/g en su modelo, encontrando una diferencia de 2 órdenes de magnitud en PI mediante un modelo dosis-respuesta exponencial. Chen y col. (2003) hallaron una reducción en el número de casos en la población de alto riesgo de 2,72 unidades logarítmicas, empleando también un modelo dosis-respuesta exponencial (estos autores no consideraron la población de bajo riesgo en su análisis).

Así pues, se puede deducir que si, idealmente, hubiera una probabilidad de rechazo de lotes defectuosos (>100 ufc/g) del 100%, nuestro modelo QMRA daría predicciones muy certeras de lo que ocurre en la realidad. Sin embargo, la probabilidad de rechazo de lotes defectuosos nunca es del 100% en los planes de muestreo. En nuestro modelo base, el nivel 100 ufc/g correspondió al percentil 51,6% de los datos simulados de $N_{\text{pack-cons}}$, dado el modelo de crecimiento empleado y los datos de temperatura y tiempos

considerados durante las 3 fases en las que se consideró crecimiento (Tabla A.3 del capítulo 7).

El análisis de sensibilidad permitió ordenar los inputs del modelo QMRA (7 inputs) de acuerdo a la sensibilidad del output *número de casos* a cambios de los valores de los inputs. Los valores de los inputs que se establecieron fueron los correspondientes a varios percentiles: (percentil 1%, 5%, 25%, 50%, 75%, 95% y 99%). De mayor a menor sensibilidad, el input *tamaño de ración* fue el primero en la clasificación, seguido por la *temperatura de almacenamiento doméstico*, el *tiempo de almacenamiento doméstico* y el *nivel de L. monocytogenes en el momento de consumo* (Figura 9 del capítulo 7). La clasificación de los inputs fue la misma tanto en la población de bajo como en la de alto riesgo, si bien el *número de casos* en la población de alto riesgo mostró mayor sensibilidad a los cuatro inputs mencionados.

Con vista a la Gestión del Riesgo, aquellos inputs al comienzo de la clasificación son los que deberían, siempre que sea factible, ser considerados en la gestión, pues son aquellos cuyos cambios producirían una mayor disminución en el número de casos de listeriosis. El *tamaño de ración* es un claro ejemplo de input no objeto de gestión, dadas las características nutricionales beneficiosas que de por sí poseen los vegetales. Es más, existe en la actualidad una promoción del consumo de frutas y hortalizas con campañas como “5 al día”. El segundo input, *la temperatura de almacenamiento doméstico*, es un factor difícilmente gestionable. La ER llevada a cabo por la U.S. Department of Agriculture (2003) identificó este factor como uno de los cinco principales factores que influyen en la exposición del consumidor a *L. monocytogenes*; los otros cuatro fueron el tamaño de ración y frecuencia de consumo del alimento RTE, la concentración y prevalencia de *L. monocytogenes* en el alimento RTE, el potencial del alimento para permitir el crecimiento del patógeno en refrigeración y la duración del almacenamiento refrigerado. El tercer y cuarto input en la clasificación, *tiempo de almacenamiento doméstico* y *nivel de L. monocytogenes en el momento de consumo*, fueron objeto de gestión, y se tratarán en el siguiente subapartado. Lindqvist y Westöö (2000) también llevaron a cabo un análisis de sensibilidad, identificando el *nivel de L. monocytogenes* como el primer input de la clasificación. Sin embargo, estos autores no modelaron la cadena “de la granja a la mesa”, por lo que cualquier factor que opere en la cadena, como son la temperatura o el tiempo de almacenamiento no fueron considerados en el análisis.

10.2. GESTIÓN DEL RIESGO

La Gestión del Riesgo constituye el “motor” para la Evaluación del Riesgo, como se dedujo del subcapítulo 1.2. *Gestión del Riesgo* (Figura 1.2 del capítulo 1). La Gestión del Riesgo debe comenzar por una identificación de los temas de seguridad alimentaria que necesitan ser tratados, seguido por la elaboración de un perfil del riesgo microbiológico (FAO/WHO, 2006). Los resultados del perfil derivan en un conjunto de decisiones como es la realización de una ER, y por lo general, un análisis de sensibilidad. Los gestores del riesgo, en colaboración con los asesores, deben decidir si la ER es adecuada para proceder a la evaluación y decisión de opciones de gestión. El documento mencionado elaborado por la FAO/WHO (2006), lista una serie de metas y opciones de gestión. En esta tesis se proponen 4 medidas de gestión vinculadas a 3 opciones (Tabla 3 del capítulo 7). Las 4 medidas, dados los distintos valores supuestos para dos de ellas (3 criterios microbiológicos, 6 vidas comerciales distintas), derivaron finalmente en 11 medidas, que se ordenaron en orden descendente de reducción en el número total de casos (Tabla 5 del capítulo 7).

De las 11 medidas, aquellas que resultaron en más de un 50% de reducción en el número de casos fueron, de mayor a menor, (i) *la inyección de gases* durante el empaquetado de las ensaladas ($\text{CO}_2 \approx 5.5\%$, $\text{O}_2 \approx 3\%$ y balance de N_2), (ii) el *almacenamiento doméstico en refrigeración de 4 días*, (iii) la *disminución del consumo de ensaladas de IV gama por parte de la población de alto riesgo*, y (iv) el *almacenamiento doméstico en refrigeración de 5 días*.

Con la primera medida se consiguió una disminución en la concentración de *L. monocytogenes* en el momento de consumo ($N_{\text{pack-cons}}$). Así, por ejemplo, con la inyección de gases propuesta, el 85,9% de los valores de $N_{\text{pack-cons}}$ fueron $\leq 4,30 \log_{10} \text{ ufc/bolsa}$ ($\leq 100 \text{ ufc/g}$), a diferencia del 51,6% en el modelo base. La segunda y cuarta medida, ambas referidas al tiempo de almacenamiento doméstico, también estaban encaminadas a reducir $N_{\text{pack-cons}}$. Siguiendo la misma línea de exposición, el porcentaje de valores de $N_{\text{pack-cons}} \leq 4,30 \log_{10} \text{ ufc/bolsa}$, fueron 83,9 y 73,2% para almacenamientos de 4 y 5 días, respectivamente. Con la tercera medida, se pretendía reducir el consumo de ensaladas de IV gama por parte de los consumidores de alto riesgo, mediante una estrategia de comunicación. Se supuso que esta comunicación produciría un efecto en el 50% de la población de alto riesgo, es decir, que el porcentaje de consumidores de estas ensaladas (P_c) en la población de alto riesgo de

nuestro modelo base, se fijó en la mitad. En el modelo base se supuso que P_c era el mismo en la población de alto y bajo riesgo.

Los resultados obtenidos con la primera medida de gestión son llamativos en tanto en cuanto se produjo una mayor disminución en el número de casos en la población de alto que en la de bajo riesgo (Tabla 5 del capítulo 7). Esto se debe a una pequeña fracción de dosis mayores que en el modelo base, situada en el extremo derecho de la curva dosis-respuesta (Farber y col., 1996b). A su vez, estas dosis mayores son resultado de una mayor densidad máxima de población (MPD) de *L. monocytogenes* en la ensalada en el momento del consumo (7,4 en lugar de 5,6 \log_{10} ufc/g en el modelo base a 13°C). Se recuerda que, con inyección de gases (Carrasco y col., 2007a) se alcanzaba una mayor MPD en la ensalada de lechuga de IV gama que sin inyección de gases (Koseki e Isobe, 2005a), al contrario de lo que ocurría con la tasa de crecimiento. La Figura 10.1 pretende ilustrar este hecho. La pequeña densidad de dosis (<1%) por encima de la dosis máxima que se obtenía con el modelo base (5,6 \log_{10} ufc/ración) (Figura 10.1.a) se sitúa a la derecha de las curvas dosis-respuesta del modelo W-G (Figura 10.1.b), habiendo en esta región una diferencia mucho mayor en la PI de la población de alto riesgo que en la PI de la de bajo riesgo. Es por esto que, pese a la disminución general de dosis que se observa en la Figura 10.1.a, que hace que disminuya el número de casos, el incremento de la dosis máxima en una pequeña proporción hace que la reducción neta en la población de alto riesgo sea menor que en la población de bajo riesgo.

Chen y col. (2003) propusieron como medida de gestión la reducción de la concentración de *L. monocytogenes* en 8 categorías de alimentos RTE, comparándolo con la reducción que se conseguiría con una disminución de la prevalencia. En cuanto a la concentración, ya se expuso en el subapartado anterior la reducción que obtuvieron en el número de casos suponiendo ≤ 100 ufc/g en los alimentos RTE. Con relación a la prevalencia, demostraron que una disminución del 50% en su valor mediana supuso una reducción del número de casos de tan sólo 0,3 unidades logarítmicas. En el modelo QMRA presentado en el capítulo 7, la disminución de la prevalencia desde el valor mediana ($Pre_{V_{pack}} = 0,0269$) hasta su mitad resultó en la misma reducción. Estos valores de $Pre_{V_{pack}}$ (la mediana y su mitad) son sólo 2 de los 50 escenarios de prevalencia que constituyeron la incertidumbre del modelo QMRA. Estos resultados no se consideraron como una medida de gestión, puesto que los 50 escenarios constituyeron la incertidumbre del modelo. No

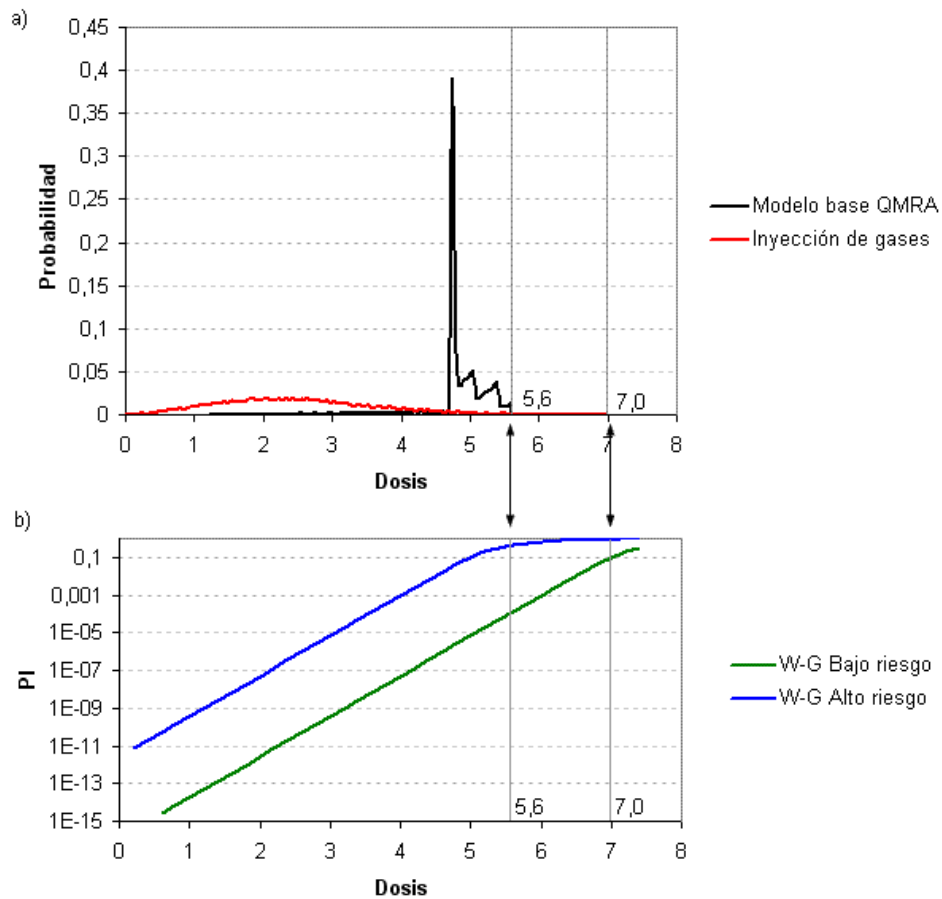


Figura 10.1. Correspondencia de las dosis en: a) su distribución de probabilidad en el modelo base QMRA y con la aplicación de gases y b) el modelo Weibull-Gamma.

obstante, mediante la aplicación de criterios microbiológicos en producción primaria (medidas de gestión 5, 6 y 10 de la Tabla 5, capítulo 7), disminuyeron los 50 valores de $PreV_{pack}$ en líneas generales, así como los rangos de incertidumbre en los planes de muestreo $n=20$ $c=0$ (disminución del 23%) y $n=30$ $c=0$ (disminución del 33%); en el plan $c=10$ $c=0$, el rango aumentó en un 16%. La Figura 10.4 muestra los 50 escenarios de $PreV_{pack}$ para el modelo base y los 3 criterios microbiológicos considerados. Se observa un desplazamiento de los datos hacia la izquierda a medida que aumentó el valor n (número de unidades de muestra).

El criterio microbiológico que dio lugar a una mayor reducción en el número de casos fue, como era de esperar, aquél con el plan de muestreo $n=30$ $c=0$, obteniendo una reducción del 44%. Como se puede observar en la

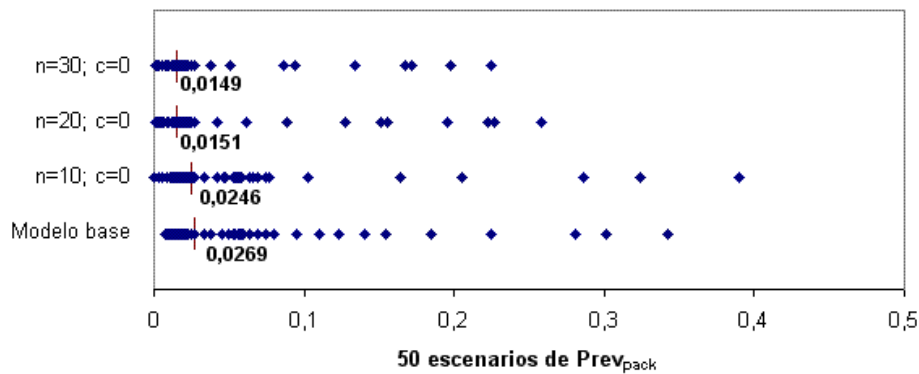


Figura 10.2. Incertidumbre de la prevalencia de *L. monocytogenes* en bolsas de ensalada de IV gama ($Prev_{pack}$) en el modelo base y tras la aplicación del criterio microbiológico *ausencia en 25 g* en 3 planes de muestreo. Los valores en negrita indican la mediana de la incertidumbre en cada caso.

Figura 10.2, la incertidumbre de la prevalencia estuvo presente en todos los casos. Este resultado pone de relevancia el hecho de que la prevalencia no se puede reducir a 0, es decir, que no se puede describir la prevalencia con un único valor, pues es imposible analizar el 100% de la producción española de ningún producto. Ahora bien, la incertidumbre se reducirá cuanto mayor sea la información que se recopile.

Se puede concluir, pues, que la medida de gestión más efectiva, y de hecho, la más factible es la aplicación de una inyección de gases en el empaquetado de la ensalada. Como se comentó anteriormente, la aplicación de gases viene siendo una práctica común en las industrias de los vegetales de IV gama, sin embargo, no existe hasta el momento, un modelo de crecimiento en ensaladas que contemple el efecto del CO_2 y la temperatura. Por otra parte, se necesitaría recopilar información acerca de la composición atmosférica en las bolsas de ensalada de IV gama que existen en el mercado, puesto que el ejemplo propuesto como primera medida de gestión es sólo un caso, habiendo múltiples posibilidades de atmósferas modificadas. Si bien existen recomendaciones para la composición de gases que se debería aplicar a la lechuga de IV gama (Institute of Food Technologists, 2001), la realidad es que se puede encontrar una amplia variedad. Por ejemplo, Warton and Wills (2002) encontraron rangos de 0,8-12,3% O_2 , 0,6-12,3% CO_2 y 0,16-1,36 ml/l etileno en bolsas de lechuga de IV gama en puntos de venta.

En la presente Tesis se proponen varias medidas para la Gestión del Riesgo de listeriosis, presentando la reducción de la carga de enfermedad que

produciría cada una de ellas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de la combinación conjunta de 2 o más medidas, como por ejemplo, la comunicación dirigida a la población de alto riesgo de los productos con mayor riesgo de listeriosis junto con una limitación de la vida comercial, por ejemplo, de 7 días. En este sentido, Havelaar y col. (2004) proponían para la Gestión del riesgo la introducción de medidas factibles y realistas según se avanza en la cadena “de la granja a la mesa”. De esta forma, se puede introducir varias medidas sin caer en la utopía. Este tipo de Gestión requeriría el consenso de un conjunto de personas representantes de diferentes sectores a los que les concierne la seguridad alimentaria (Autoridad Sanitaria, evaluadores de riesgo, asociaciones de empresarios, asociaciones de consumidores, etc.).

Por último, se señala que tanto las enfermedades alimentarias como las medidas de gestión para reducir la carga de enfermedad conllevan un gasto económico. Es la autoridad competente la que debe sopesarlos y tomar decisiones al respecto.

VI. CONCLUSIONES

PRIMERA. Aunque son preferibles los modelos de crecimiento secundarios para predecir el crecimiento microbiano, se demuestra que con los datos de crecimiento en el alimento modelados mediante un modelo primario, se obtienen predicciones de tasas de crecimiento más realistas, no tan conservadoras, y muy apropiadas para la demostración, por parte del fabricante de ensaladas de IV gama, de la no superación de 100 ufc/g de *L. monocytogenes* a lo largo de la vida comercial de estos productos.

SEGUNDA. La velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en lechuga de IV gama envasada con inyección de gases fue inferior a la observada por otros autores sin inyección de gases a 5 y 13°C. Consecuentemente, se recomienda el empleo de gases para aumentar la seguridad de estos productos con respecto a *L. monocytogenes*. Sin embargo, al considerar el parámetro densidad máxima de población, se observó justamente lo contrario, probablemente debido a que la inyección de gases frenó el crecimiento de la flora microbiana aerobia de la ensalada, y esto permitió mayores niveles de *L. monocytogenes* en el producto.

TERCERA. La fase de adaptación de *L. monocytogenes* en lechuga de IV gama mantenida a 13°C y envasada con inyección de gases, podría equipararse a la observada por otros autores sin inyección de gases, posiblemente debido al efecto inhibitorio de la atmósfera modificada, junto al efecto estimulante del inóculo adaptado previamente a 7°C. En las muestras mantenidas a 5°C y envasadas con inyección de gases se observó una fase de adaptación mayor en comparación con la observada por otros autores sin inyección de gases, concluyéndose, pues, que la baja temperatura junto con la atmósfera empleada en este estudio, ejercen un efecto sinérgico para frenar el crecimiento de *L. monocytogenes* y prolongar su fase de adaptación.

CUARTA. En los casos en los que se detecte la presencia de *Listeria monocytogenes* en ensaladas de endivias a niveles inferiores al límite de detección (≤ 10 ufc/g), los fabricantes podrán acogerse al criterio microbiológico de 100 ufc/g, empleando una de las 9 condiciones de

atmósfera modificada y vida comercial propuestas, demostrando así a la autoridad sanitaria que su producto no excederá dicho nivel durante el periodo de vida comercial en consonancia con lo establecido por el Reglamento (CE) N° 2073/2005.

QUINTA. Desde el punto de vista técnico, se considera desaconsejable el cálculo del nivel inicial de *L. monocytogenes* al comienzo de la vida comercial partiendo de un nivel de 100 ufc/g al final de la misma, puesto que un gran porcentaje de los resultados obtenidos (distribución de probabilidad de los niveles iniciales) carece de sentido biológico por estar por debajo de 1 ufc/g.

SEXTA. El modelado matemático del proceso de lavado y troceado de la lechuga en la industria dio como resultado una disminución de la prevalencia de *L. monocytogenes* en el producto acabado, con respecto a la prevalencia en el producto fresco, y una disminución de la concentración de patógenos en el lote, reduciéndose 1,9 unidades logarítmicas el valor 95% percentil. Por tanto, modelar estos procesos en la Evaluación Cuantitativa del Riesgo ejerce un efecto positivo sobre la salud pública.

SÉPTIMA. La temperatura observada en los frigoríficos domésticos es perfectamente compatible con el crecimiento de *L. monocytogenes*, y excede en un 75,6% la temperatura de almacenamiento recomendada por el fabricante (5°C). Si la determinación de la fecha de caducidad se basara en el crecimiento de *L. monocytogenes*, debería llevarse a cabo a una temperatura superior a la recomendada por el fabricante, proponiéndose como valor de referencia “seguro” 10°C, correspondiente al 90% percentil de la distribución de temperaturas de los frigoríficos domésticos. Por otra parte, dado que una proporción considerable de la población (≈10%) no siempre respeta la fecha de caducidad, el riesgo de listeriosis se vería incrementado.

OCTAVA. La investigación llevada a cabo en la presente Tesis Doctoral constata la carencia o no disponibilidad de información sobre el procesado de ensaladas de IV gama, que si bien se supone de tipo

confidencial, constituye una herramienta fundamental para la Evaluación del Riesgo por parte de la autoridad sanitaria competente, por lo que sólo se pueden realizar aproximaciones y suposiciones. Asimismo, se detecta la carencia de otros recursos como son modelos de crecimiento de *L. monocytogenes* en ensaladas de IV gama que incluyan factores como temperatura y CO₂, o modelos de reducción del patógeno mediante lavado que contemplen factores como la concentración de desinfectante, tiempo de lavado y/o ratio volumen de agua/producto.

NOVENA. Debido a la inexistencia de un modelo de crecimiento para *L. monocytogenes* que contemple la aplicación de distintas mezclas de gases en ensaladas de IV gama, el valor de los resultados de la Evaluación del Riesgo (ER) residió fundamentalmente en su aplicación en la Gestión del Riesgo, en tanto en cuanto los resultados de dicha evaluación, constituyeron el parámetro de comparación entre las diferentes medidas de gestión propuestas. No obstante, con los supuestos y los modelos matemáticos considerados en la ER, se puede concluir que la aplicación efectiva (100%) del criterio de 100 ufc/g de *L. monocytogenes* a lo largo de la vida comercial de estos productos, da como resultado en la ER un número de casos coherente con el número de casos de listeriosis observados en España.

DÉCIMA. De las 11 medidas de gestión consideradas, aquellas encaminadas a reducir la concentración de *L. monocytogenes* en las ensaladas de IV gama, es decir, la inyección de gases y un tiempo de almacenamiento doméstico inferior a 5 días, son las que proporcionan una mayor reducción en el número de casos de listeriosis en España.

UNDÉCIMA. Del análisis de la normativa legal se deduce la necesidad de armonización de criterios por parte de la autoridad competente para llevar a cabo estudios como los de la presente Tesis. Tal armonización incluiría, por ejemplo, el establecimiento de valores de temperatura y su descripción (p. ej., distribución de probabilidad o escenarios desfavorables), los modelos de predicción empleados para una combinación producto-proceso o el modelo dosis-respuesta que

describa mejor la enfermedad alimentaria objeto de estudio, listeriosis en este caso. En la presente Tesis, esto se ilustra observando los distintos resultados derivados de la aplicación de uno u otro modelo. Sólo mediante la armonización se podrán contrastar los resultados (número de casos, clasificación de factores en un análisis de sensibilidad, etc.), y tomar decisiones al respecto.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anon. (1997). Guidelines for Good Hygienic Practice in the Manufacture of Chilled Foods. Chilled Food Association. London, United Kingdom.
- Anon. (1998). Multi-state outbreak of listeriosis - United States, 1998. *Mortality Weekly Report* 47, 1085-1086.
- Anon. (1999). Update: multistate outbreak of listeriosis - United States, 1998-1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 47, 1117-1118.
- Anon. (2000). Outbreak of *Listeria monocytogenes* serovar 4b infection in France. *Communicable Disease Report* 10, 81-84.
- Anon. (2004). COST 920 on Foodborne Zoonoses, Working group 3 Quantitative Risk Assessment. Proceedings of the Workshop on data needs in risk assessment, Pamplona, Spain, 28-30 junio 2004. Disponible en: <http://www.cost920.com/PamplonaProceedings.pdf>.
- Abee, T., Rombouts, F. M., Hugenholtz, J., Guihard, G. y Letellier, L. (1994). Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott-A grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1962-1968.
- Afchain, A. L., Derens, E., Guilpart, J. y Cornu, M. (2005). Statistical modelling of cold-smoked salmon temperature profiles for risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *Acta Horticulturae (ISHS)* 674, 383-388.
- Ahvenainen, R. (1996). New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* 7, 179-187.
- Alghazali, M. R. y Alazawi, S. K. (1990). *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage-sludge cake. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 642-647.
- Ameyugo, U., Acosta M. C., Antón F., Chavernas F., Conejo J. A., Hidalgo M. C., Peinado J., Ruíz I., Sánchez-Laulhé R. y Santos R. (2003). Documento orientativo de especificaciones de sistemas de autocontrol. En: Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (ed.). Micrapel. Sevilla, España.
- Anon. (2006). Commodity specific food safety guidelines for the lettuce and leafy greens supply chain. En: Gorny J. R., Giclas H., Gombas D. y Means K. (eds.), 1ª edición.
- Aranceta, J., Rodrigo, C. P., Majem, L. S., Barba, L. R., Izquierdo, J. Q., Vioque, J., Mari, J. T., Verdu, J. M., Gonzalez, J. L., Tojo, R. y Sala, M. F. (2003).

- Prevalence of obesity in Spain: Results of the SEEDO 2000 study. *Medicina Clinica* 120, 608-612.
- Arnold, G. J. y Coble, J. (1995). Incidence of *Listeria* Species in Foods in Nsw. *Food Australia* 47, 71-75.
- Arumugaswamy, R. K., Ali, G. R. R. y Hamid, S. N. B. A. (1994). Prevalence of *Listeria Monocytogenes* in Foods in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology* 23, 117-121.
- Audits International. (2000). 1999 U.S. Food temperature evaluation. Design and summary pages. *Audits International and U. S. Food and Drug Administration*.
- Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. y Salmaso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England journal of medicine* 342, 1236-1241.
- Azevedo, I., Regalo, M., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. y Gibbs, P. A. (2005). Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control* 16, 121-124.
- Baker, M., Brett, M., Short, P., Calder, L. y Thornton, R. (1993). Listeriosis and mussels. *Communicable Disease New Zealand* 93, 12-15.
- Baranyi, J. (2002). Stochastic modelling of bacterial lag phase. *International Journal of Food Microbiology* 73, 203-206.
- Baranyi, J. y Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Baranyi, J. y Tamplin, M. L. (2004). ComBase: A common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection* 67, 1967-1971.
- Barriga, M. I., Trachy, G., Willemot, C. y Simard, R. E. (1991). Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. *Journal of Food Science* 56, 1586-1599.
- Baur, S., Klaiber, R., Wei, H., Hammes, W. P. y Carle, R. (2005). Effect of temperature and chlorination of pre-washing water on shelf-life and physiological properties of ready-to-use iceberg lettuce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6, 171-182.

- Baylis, C. (2000). The Catalogue of Rapid Microbiological Methods, Review No. 1, 4ª edición. Campden and Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden. Gloucestershire, UK.
- Beattie, G. A. y Lindow, S. E. (1999). Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. *Phytopathology* 89, 353-359.
- Bell, C. y Kyriakides A. (2000). *Listeria*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos, 1ª edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Bell, C. (2002). *Listeria monocytogenes*. Cap. 12. En: Blackburn C. d. W. y McClure P. J. (eds.). Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, USA, pp. 337-361.
- Beltran, D., Selma, M. V., Marin, A. y Gil, M. I. (2005). Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5654-5663.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M. H., Griffiths, M. W. y Cerf, O. (1998). Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine* 37, 129-145.
- Bennik, M. H. J., Peppelenbos, H. W., Nguyen-The, C., Carlin, F., Smid, E. J. y Gorris, L. G. M. (1996). Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. *Postharvest Biology and Technology* 9, 209-221.
- Berrang, M. E., Brackett, R. E. y Beuchat, L. R. (1989). Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled-atmosphere. *Journal of Food Protection* 52, 702-705.
- Beuchat, L. R., Adler, B. B. y Lang, M. M. (2004). Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and Romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection* 67, 1238-1242.
- Beuchat, L. R. y Brackett, R. E. (1990a). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *Journal of Food Science* 55, 755-758.

- Beuchat, L. R. y Brackett, R. E. (1990b). Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1734-1742.
- Beuchat, L. R. y Brackett, R. E. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1367-1371.
- Beuchat, L. R., Nail, B. V., Adler, B. B. y Clavero, M. R. S. (1998). Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *Journal of Food Protection* 61, 1305-1311.
- Bille, J. (1990). Emidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. *Cap. 12*. En: Miller A. J., Smith J. L. y Somkuti G. A. (eds.). *Foodborne listeriosis*. Elsevier. Amsterdam, Holanda, pp. 71-74.
- Boerlin, P. y Piffaretti, J. C. (1991). Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1624-1629.
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jacquet, C. y Piffaretti, J. C. (1992). *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 69-73.
- Bolin, H. R. y Huxsoll, C. C. (1991). Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad cut lettuce. *Journal of Food Science* 56, 60-&.
- Bolton, L. F. y Frank, J. F. (1999). Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content. *Journal of Food Protection* 62, 601-609.
- Brackett, R. E. (1987). Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 50, 999-1003.
- Breer, C. y Baumgartner, A. (1992). Occurrence and behavior of *Listeria monocytogenes* on salads, vegetables, and in fresh vegetable juices. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* 43, 108-110.
- Brocklehurst, T. (2004). Challenge of food and the environment. *Cap. 5*. En: McKellar R. C. y Lu X. (eds.). *Modeling microbial responses in foods*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, pp. 197-232.
- Buchanan, R. (2002). The role of quantitative microbiological risk assessment in risk management options. Joint FAO/WHO expert meetings on microbiological

- risk assessment. Kiel, Germany, 18-22 marzo 2002. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agn/jemra/papers.stm#country>.
- Buchanan, R. L., Damert, W. G., Whiting, R. C. y van Schothorst, M. (1997). Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *Journal of Food Protection* 60, 918-922.
- Buchanan, R. L. y Phillips, J. G. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration, and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 53, 370-376.
- Buchanan, R. L., Smith, J. L. y Long, W. (2000). Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *International Journal of Food Microbiology* 58, 159-172.
- Buchanan, R. L., Stahl, H. G. y Whiting, R. C. (1989). Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52, 844-851.
- Buchanan, R. L. y Whiting, R. C. (1996). Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection* 31-36.
- Buchrieser, C., Brosch, R., Catimel, B. y Rocourt, J. (1993). Pulsed-field gel-electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 395-401.
- Burmaster, D. E. y Anderson, P. D. (1994). Principles of good practice for the use of Monte Carlo techniques in human health and ecological risk assessments. *Risk Analysis* 14, 477-481.
- Burnett, A. B., Iturriaga, M. H., Escartin, E. F., Pettigrew, C. A. y Beuchat, L. R. (2004). Influence of variations in methodology on populations of *Listeria monocytogenes* recovered from lettuce treated with sanitizers. *Journal of Food Protection* 67, 742-750.
- Carlin, F., Nguyen-The, C. y Morris, C. E. (1996a). Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Cichorium endivia* var *latifolia*). *Journal of Food Protection* 59, 698-703.

- Carlin, F., Nguyen-The, C., DaSilva, A. A. y Cochet, C. (1996b). Effects of carbon dioxide on the fate of *Listeria monocytogenes* of aerobic bacteria and on the development of spoilage in minimally processed fresh endive. *International Journal of Food Microbiology* 32, 159-172.
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R. M. y Zurera, G. (2007a). Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Control*. In press .
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R. M. y Zurera, G. (2007b). Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for listeriosis. *Journal of Food Protection*. In press.
- Carrasco, E., Valero, A., Perez-Rodriguez, F., Garcia-Gimeno, R. M. y Zurera, G. (2007c). Management of microbiological safety of ready-to-eat meat products by mathematical modelling: *Listeria monocytogenes* as an example. *International Journal of Food Microbiology* 114, 221-226.
- Cassin, M. H., Paoli, G. M., Mccoll, R. S. y Lammerding, A. M. (1996). Hazard assessment of *Listeria monocytogenes* in the processing of bovine milk - Comment. *Journal of Food Protection* 59, 341-342.
- CFSAN (Center for Food Safety and Applied Nutrition). (2006). Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables. Draft guidance. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration.
- CFSAN (Center for Food Safety and Applied Nutrition). (1998). Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration.
- Chen, Y. H., Ross, E. H., Scott, V. N. y Gombas, D. E. (2003). *Listeria monocytogenes*: Low levels equal low risk. *Journal of Food Protection* 66, 570-577.
- Codex Alimentarius. (1996). Establishment of sampling plans for microbiological safety criteria for food in international trade including recommendations for control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter* and entero-haemorrhagic *E. coli*. Agenda item 11, CX/FH 96/9 1-16. Codex Alimentarius Commission. Roma, Italia.
- Codex Alimentarius. (1997). Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods. CAC/GL-21. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp.

- Codex Alimentarius. (1999). Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. CAC/GL-30. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf.
- Codex Alimentarius. (2003). Recommended international code of practice general principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 2003. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/23/cxp_001e.pdf.
- Codex Alimentarius. (2004). Report of the twentieth session of the Codex Committee on General Principles, Paris, France, 3-7 mayo 2004. ALINORM 04/27/33A, Appendix II. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm04/al0433ae.pdf>.
- Colburn, K. G., Kaysner, C. A., Abeyta, C. y Wekell, M. M. (1990). *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2007-2011.
- Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. (2003). Tercer plan andaluz de salud 2003-2008. Junta de Andalucía. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/salud/principal/>.
- Corlett, D. A. y Pierson, M. D. (1992). Hazard analysis and assignment of risk categories. En: Pierson M. D. y Corlett D. A. (eds.). HACCP: Principles and Applications. Van Nostrand Reinhold. New York, USA, pp. 29-38.
- Cossart, P. (1995). Actin-based bacterial motility. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 94-101.
- Cossart, P. y Kocks, C. (1994). The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 13, 395-402.
- Cossart, R. y Mengaud, J. (1989). *Listeria monocytogenes*: a model system for the molecular study on intracellular parasitism. *Molecular biology & medicine* 6, 463-474.
- Council of the European Communities. (1992). Council Directive 92/46/EEC of 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat treated milk and milk based products. *Official Journal L* 268, 1-32.
- Cox, L. J., Kleiss, T., Cordier, J. L., Cordella, C., Konkel, C., Pedrazzini, C., Beumer, R. y Siebenga, A. (1989). *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology* 6, 49-61.

- Dahms, S. (2004). Sampling plans and microbiological criteria as risk management options in recently developed food safety concepts. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 117, 193-200.
- Dalton, C. B., Austin, C. C., Sobel, J., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Graves, L. M., Swaminathan, B., Proctor, M. E. y Griffin, P. M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine* 336, 100-105.
- Daniels, J. A., Krishnamurthi, R. y Rizvi, S. S. H. (1985). A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection* 48, 532-537.
- Davis, H. J., Taylor, P., Perdue, J. N., Stelma, G. N., Humphreys, J. M., Rowntree, R. y Green, K. D. (1988). A shigellosis outbreak linked to commercially distributed lettuce. *American Journal of Epidemiology* 128, 1312-1321.
- De Simón, M. y Ferrer, M. D. (1998). Initial numbers, serovars and phagevars of *Listeria monocytogenes* isolated in prepared foods in the city of Barcelona (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 44, 141-144.
- De Simón, M., Tarragó, C. y Ferrer, M. D. (1992). Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 16, 153-156.
- Dean, J. P. y Zottola, E. A. (1996). Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 59, 476-480.
- Delaquis, P. J., Stewart, S., Cliff, M., Toivonen, P. M. y Moyls, A. L. (2000). Sensory quality of ready-to-eat lettuce washed in warm, chlorinated water. *Journal of Food Quality* 23, 553-563.
- Den Aantrekker, E. D., Beumer, R. R., van Gerwen, S. J. C., Zwietering, M. H., van Schothorst, M. y Boom, R. M. (2003). Estimating the probability of recontamination via the air using Monte Carlo simulations. *International Journal of Food Microbiology* 87, 1-15.
- Devlieghere, F. y Debevere, J. (2000). Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie* 33, 531-537.
- Devlieghere, F., Debevere, J. y Van Impe, J. (1998). Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified

- atmosphere on microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 43, 105-113.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Vandewaetere, B., Van Impe, J. y Debevere, J. (2001). Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology* 18, 53-66.
- Dijkstra, R. G. (1982). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface-water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage-treatment plant. *Zentralblatt fur Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Serie B-Umwelthygiene Krankenhaushygiene Arbeitshygiene Praventive Medizin* 176, 202-205.
- Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* (12 diciembre 2003), L325.
- Doyle, M. P. (1988). Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Food Technology* 42, 169-171.
- Dramsi, S., Lebrun, M. y Cossart, P. (1996). Molecular and genetic determinants involved in invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*. *Bacterial Invasiveness* 209, 61-77.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2004). Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in Spain in 2004. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/1290.html.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2007). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on microbiological criteria and targets based on risk analysis. *The EFSA Journal* 462, 1-26. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/en/science/biohaz/biohaz_opinions/ej462_micro_criteria.html.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2006b). Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. *The EFSA Journal* 2005-310. Disponible en: http://www.efsa.eu.int/science/monitoring_zoonoses/reports/1277_en.html.

- EFSA (European Food Safety Authority) (2006a). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal* 94. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/zoonoses_report_2005.html.
- EPA (United States Environmental Protection Agency) (1997). Guiding principles for Monte Carlo analysis. EPA/630/R-91/001. Washington, USA.
- Fain, A. R. (1996). A review of the microbiological safety of fresh salads. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 16, 146-149.
- FAO/WHO (1998). Application of risk communication to food standards and food safety. A Joint FAO/WHO expert consultation.2 - 6 febrero 1998. Roma, Italia.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for incorporating quantitative risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts. Joint FAO/WHO expert meetings on microbiological risk assessment. 18-22 marzo 2002, Kiel, Alemania. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/jemra/riskmanagement_en.stm.
- FAO/WHO (2003). Hazard characterization for pathogens in food and water. Guidelines. Microbial Risk Assessment, N° 4. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/jemra/hazard_en.stm.
- FAO/WHO (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods – Technical report. Microbial Risk Assessment Series 4. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/jemra/listeria_en.stm.
- FAO/WHO (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 abril 2006. Kiel, Alemania. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/jemra/riskmanagement_en.stm
- Farber, J. M. (1991). *Listeria monocytogenes* in fish products. *Journal of Food Protection* 54, 922-924.
- Farber, J. M., Cai, Y. y Ross, W. H. (1996a). Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *International Journal of Food Microbiology* 32, 133-144.

- Farber, J. M., Coates, E. D. F., Beausoleil, N. y Fournier, J. (1991). Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 2606-2608.
- Farber, J. M. y Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55, 476-511.
- Farber, J. M., Ross, W. H. y Harwig, J. (1996b). Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology* 30, 145-156.
- Fernández, P. S., George, S. M., Sills, C. C. y Peck, M. W. (1997). Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 37, 37-45.
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., Macdonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. y Reingold, A. L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine* 312, 404-407.
- Flores, J., Andreu E., Martínez M.C., Carrillo J.A., Nombela A., Periago M.J. y Ros G. (2004). Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en la industria de vegetales congelados. Dificultad de propuesta de estrategias para su reducción. Acta del XIV Congreso de microbiología de los alimentos. 19-22 septiembre 2004. Gerona, España, p.101.
- Foegeding, P. M. (1997). Driving predictive modelling on a risk assessment path for enhanced food safety. *International Journal of Food Microbiology* 36, 87-95.
- Francis, G. A. y O'Beirne, D. (1997). Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 141-151.
- Francis, G. A. y O'Beirne, D. (1998a). Effects of storage atmosphere on *Listeria monocytogenes* and competing microflora using a surface model system. *International Journal of Food Science and Technology* 33, 465-476.
- Francis, G. A. y O'Beirne, D. (1998b). Effects of the indigenous microflora of minimally processed lettuce on the survival and growth of *Listeria innocua*. *International Journal of Food Science and Technology* 33, 477-488.

- Francis, G. A., Thomas, C. y O'Beirne, D. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 34, 1-22.
- Francois, K., Valero, A., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., Debevere, J., García-Gimeno, R. M., Zurera, G. y Devlieghere, F. (2007). Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures. *Food Microbiology* 24, 32-43.
- FSA (Food Standards Agency (UK)). (2000). A report of the study of infectious intestinal disease in England. The Stationery Office. London, UK.
- Gagliardi, J. V. y Karns, J. S. (2000). Leaching of *Escherichia coli* O157 : H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 877-883.
- Gaitán, A. (2001). Psychrotrophic microorganisms: agar plate methods, homogenization, and dilutions. *Cap. 1*. En: Spencer J. F. T. y Ragout de Spencer A. L. (eds.). *Food Microbiology Protocols*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, pp. 3-10.
- García, A., Mount, J. R. y Davidson, P. M. (2003). Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce. *Journal of Food Science* 68, 2747-2751.
- García-Gimeno, R. M. y Zurera-Cosano, G. (1997). Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* 36, 31-38.
- García-Gimeno, R. M., Zurera-Cosano, G. y Amaro-López, M. (1996). Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetable salads in Spain. *Journal of Food Safety* 16, 75-86.
- Garg, N., Churey, J. J. y Splittstoesser, D. F. (1990). Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection* 53, 701-703.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D. y Farver, T. B. (1991). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4°C to 30°C. *Journal of Food Protection* 54, 662-668.
- Genigeorgis, C. A., Oanca, P. y Dutulescu, D. (1990). Prevalence of *Listeria* spp in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse sevel. *Journal of Food Protection* 53, 282-288.

- Geuenich, H. H., Muller, H. E., Schretten-Brunner, A. y Seeliger, H. P. (1985). The occurrence of different *Listeria* species in municipal waste water. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* 181, 563-565.
- Gleeson, E. y O'Beirne, D. (2005). Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control* 16, 677-685.
- Gombas, D. E., Chen, Y. H., Clavero, R. S. y Scott, V. N. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection* 66, 559-569.
- Gorny, J. R. (2003). Innovative fresh-cut technologies and business/marketing strategies. En: Colelli G. y Amodio M. L. (eds.). Improving quality management in the minimally-processed fruit and vegetables industry of the Euro-Med area (IQM-MED, No. ICA3-CT-2000-30004). Università degli Studi di Foggia - Facoltà di Agraria. 13-14 diciembre 2003. Foggia, Italy, pp. 14-22.
- Gorris, L. G. M. (2005). Food safety objective: An integral part of food chain management. *Food Control* 16, 801-809.
- Goulet, V., Jacquet, C., Vaillant, V., Rebiere, I., Mouret, E., Lorente, C., Maillot, E., Stainer, F. y Rocourt, J. (1995). Listeriosis from consumption of raw milk cheese. *Lancet* 345, 1581-1582.
- Goulet, V., Lepoutre, A., Rocourt, J., Courtieu, A. L., Dehaumont, P. y Veit, P. (1993). Épidémie de listériose en France - Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bulletin Épidémiologique Hebdomaire* 4, 13-14.
- Grau, F. H. (1993). Processed meats and *Listeria monocytogenes*. Prevention of *Listeria* in processed meats. Proceedings of a series of workshops. CSIRO Division of Food Science and Technology, Meat Research Laboratory. Queensland, Australia.
- Graves, L. M., Swaminathan, B., Reeves, M. W., Hunter, S. B., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D. y Schuchat, A. (1994). Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2936-2943.
- Gudbjornsdottir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjoberg, A. M., Niclasen, O. y Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology* 21, 217-225.

- Guerra, M. M., McLauchlin, J. y Bernardo, F. A. (2001). *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology* 18, 423-429.
- Gunaseena, D. K., Kodikara, C. P., Ganepola, K. y Widanapathirana, S. (1995). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Sri Lanka. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka* 23, 107-114.
- Guyer, S. y Jemmi, T. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1523-1527.
- Haas, C. N. (1983). Estimation of risk due to low-doses of microorganisms - A comparison of alternative methodologies. *American Journal of Epidemiology* 118, 573-582.
- Harvey, J. y Gilmour, A. (1993). Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern-Ireland. *International Journal of Food Microbiology* 19, 193-205.
- Hathaway, S. C. (1997). Development of food safety risk assessment guidelines for foods of animal origin in international trade. *Journal of Food Protection* 60, 1432-1438.
- Hathaway, S. C. y Cook, R. L. (1997). A regulatory perspective on the potential uses of microbial risk assessment in international trade. *International Journal of Food Microbiology* 36, 127-133.
- Havelaar, A. H., Nauta, M. J. y Jansen, J. T. (2004). Fine-tuning Food Safety Objectives and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 93, 11-29.
- Hildebrandt, G., Bohmer, L. y Dahms, S. (1995). 3-class attributes plans in microbiological quality-control - A contribution to the discussion. *Journal of Food Protection* 58, 784-790.
- Hillborn, E. D., Mermin, J. H., Mshar, P. A., Hadler, J. L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M. A. y Farrar, J. A. (1999). A multistate outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine* 159, 1758-1764.

- Ho, J. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckind, P. y Fraser, D. W. (1986). An outbreak of type-4B *Listeria monocytogenes* infection involving patients from 8 Boston hospitals. *Archives of Internal Medicine* 146, 520-524.
- Holcomb, D. L., Smith, M. A., Ware, G. O., Hung, Y. C., Brackett, R. E. y Doyle, M. P. (1999). Comparison of six dose-response models for use with foodborne pathogens. *Risk Analysis* 19, 1091-1100.
- Hudson, C. B. (1991). Risk assessment and risk management - key factors in food safety decision-making. *Food Australia* 43, S10-S12.
- Huss, H. H., Reilly, A. y Ben Embarek, P. K. (2000). Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11, 149-156.
- Husu, J. R., Seppanen, J. T., Sivela, S. K. y Rauramaa, A. L. (1990a). Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 37, 268-275.
- Husu, J. R., Sivela, S. K. y Rauramaa, A. L. (1990b). Prevalence of *Listeria* species as related to chemical quality of farm ensiled grass. *Grass and Forage Science* 45, 309-314.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1998). Microorganismos de los alimentos 5. Características de los patógenos microbianos. En: Roberts T. A., Baird-Parker A. C. y Tompkin R. B. (eds.). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (2004). Microorganismos de los alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1980). Microorganisms in foods 3. Microbial ecology of foods. Volumen 1: Factors affecting life and death of microorganisms. Academic Press. New York, USA.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2002). Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.

- Ihl, M., Aravena, L., Scheuermann, E., Uquiche, E. y Bifani, V. (2003). Effect of immersion solutions on shelf life of minimally processed lettuce. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 36, 591-599.
- Institute of Food Technologists. (2001). Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. IFT/FDA Contract No. 223-98-2333. U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F. y Debevere, J. (2002). Temperature dependence of shelf life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. *Postharvest Biology and Technology* 26, 59-73.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Ragaert, P., Vanneste, E. y Debevere, J. (2003). Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology* 83, 263-280.
- Jay, J. M. (1996). Prevalence of *Listeria* spp in meat and poultry products. *Food Control* 7, 209-214.
- Jensen, A. (1993). Excretion of *Listeria monocytogenes* in feces after listeriosis - Rate, quantity and duration. *Medical Microbiology Letters* 2, 176-182.
- Jeong, D. K. y Frank, J. F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10-degrees-C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection* 57, 576-586.
- Johnsen, K. G., Leitao, J., Herikstad, H., Andersson, Y., Langeland, G., Gondrosen, B. y Lassen, J. (1995). Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 609-614.
- Johnson, A. E., Donkin, A. J., Morgan, K., Lilley, J. M., Neale, R. J., Page, R. M. y Silbum, R. (1998). Food safety knowledge and practice among elderly people living at home. *Journal of Epidemiology and Community Health* 52, 745-748.
- Johnson, J. L., Doyle, M. P. y Cassens, R. G. (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in meat and meat-products - A review. *Journal of Food Protection* 53, 81-91.
- Jones, D. (1990). Foodborne illness - foodborne listeriosis. *The Lancet* 336, 1171-1174.

- Jouve, J. L. (1992). HACCP et systemes qualite (ISO 9000). *Option Qualite* 97, 11-15.
- Jouve, J. L. (1996). La qualite microbiologique des aliments-maitrise et criteres. En: Jouve J. L. (ed.), 2^a edici3n. Polytechnica. Paris, Francia.
- Kim, J. H., Lee, J. W., Kim, J. H., Seo, J. H., Han, S. B., Chung, H. J. y Byun, M. W. (2006). Effect of gamma irradiation on *Listeria ivanovii* inoculated to iceberg lettuce stored at cold temperature. *Food Control* 17, 397-401.
- King, A. D., Magnuson, J. A., Torok, T. y Goodman, N. (1991). Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. *Journal of Food Science* 56, 459-461.
- King, T., Ferenci, T. y Szabo, E. A. (2003). The effect of growth atmosphere on the ability of *Listeria monocytogenes* to survive exposure to acid, proteolytic enzymes and bile salts. *International Journal of Food Microbiology* 84, 133-143.
- Koseki, S. e Isobe, S. (2005a). Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. *International Journal of Food Microbiology* 101, 217-225.
- Koseki, S. e Isobe, S. (2005b). Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *International Journal of Food Microbiology* 104, 239-248.
- Kothary, M. H. y Babu, U. S. (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: A review. *Journal of Food Safety* 21, 49-73.
- Kozak, J., Balmer, T., Byrne, R. y Fisher, K. (1996). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. *Food Control* 7, 215-221.
- Lammerding, A. M. (1997). An overview of microbial food safety risk assessment. *Journal of Food Protection* 60, 1420-1425.
- Lammerding, A. M. y Fazil, A. (2000). Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 58, 147-157.
- Lammerding, A. M. y McKellar, R. C. (2004). Cap. 8. Predictive microbiology in quantitative risk assessment. Cap. 8. En: McKellar R. C. y Lu X. (eds.). Modeling microbial responses in foods. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, pp. 263-284.

- Lang, M. M., Harris, L. J. y Beuchat, L. R. (2004). Survival and recovery of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on lettuce and parsley as affected by method of inoculation, time between inoculation and analysis, and treatment with chlorinated water. *Journal of Food Protection* 67, 1092-1103.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C. M., Guyonnet, J. P., Mafart, P. y Thuault, D. (2002). Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73, 219-237.
- Le Marc, Y., Pin, C. y Baranyi, J. (2005). Methods to determine the growth domain in a multidimensional environmental space. *International Journal of Food Microbiology* 100, 3-12.
- Legan, J. D., Vandeven, M. H., Dahms, S. y Cole, M. B. (2001). Determining the concentration of microorganisms controlled by attributes sampling plans. *Food Control* 12, 137-147.
- Legnani, P., Leoni, E., Berveglieri, M., Mirolo, G. y Alvaro, N. (2004). Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food Control* 15, 205-211.
- Li, Y., Brackett, R. E., Shewfelt, R. L. y Beuchat, L. R. (2001). Changes in appearance and natural microflora on iceberg lettuce treated in warm, chlorinated water and then stored at refrigeration temperature. *Food Microbiology* 18, 299-308.
- Li-Cohen, A. E. y Bruhn, C. M. (2002). Safety of consumer handling of fresh produce from the time of purchase to the plate: A comprehensive consumer survey. *Journal of Food Protection* 65, 1287-1296.
- Lin, C. M., Fernando, S. Y. y Wei, C. I. (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetable salads. *Food Control* 7, 135-140.
- Lindqvist, R. y Westöö, A. (2000). Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. *International Journal of Food Microbiology* 58, 181-196.
- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A. y Broome, C. V. (1988). Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine* 319, 823-828.

- Lobo, G. y González, M. (2006). Estado actual de los productos mínimamente procesados en España. IV Encuentro Nacional Sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortalizas y I Simposio Ibero-americano de Vegetais Frescos Cortados. 4 - 7 abril 2006. Brasil.
- Loncarevic, S., Johannessen, G. S. y Rorvik, L. M. (2005). Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in Applied Microbiology* 41, 186-189.
- Lovett, J., Francis, D. W. y Hunt, J. M. (1987). *Listeria monocytogenes* in raw milk - Detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection* 50, 188-192.
- Lund, B. M., Knox, M. R. y Cole, M. B. (1989). Destruction of *Listeria monocytogenes* during microwave cooking. *Lancet* 1, 218-218.
- Lyytikäinen, O., Ruutu, P., Mikkola, J., Siitonen, A., Maijala, R., Hatakka, M. y Autio, T. (1999). An outbreak of listeriosis due to *Listeria monocytogenes* serotype 3a from butter in Finland. *Eurosurveillance Weekly* 11, 1-2.
- MacGowan, A. P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P. M. y Reeves, D. S. (1994). The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp in shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources. *International Journal of Food Microbiology* 21, 325-334.
- Marchetti, R., Casadei, M. A. y Guerzoni, M. E. (1992). Microbial population dynamics in ready-to-use vegetable salads. *Italian Journal of Food Science* 2, 97-108.
- Martin, S. A., Wallsten, T. S. y Beaulieu, N. D. (1995). Assessing the risk of microbial pathogens - Application of a judgment- Encoding methodology. *Journal of Food Protection* 58, 289-295.
- Mascola, L., Sorvillo, F., Goulet, V., Hall, B., Weaver, R. y Linnan, M. (1992). Fecal carriage of *Listeria monocytogenes* - Observations during a community-wide, common-source outbreak. *Clinical Infectious Diseases* 15, 557-558.
- Mazurier, S. I. y Wernars, K. (1992). Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. *Research in Microbiology* 143, 499-505.
- McClure, P. J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T. M. y Roberts, T. A. (1993). A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage

- temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* 19, 161-178.
- McClure, P. J., Beaumont, A. L., Sutherland, J. P. y Roberts, T. A. (1997). Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes* - The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *International Journal of Food Microbiology* 34, 221-232.
- McLauchlin, J. (1993). Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. *Environmental. Policy and Practice*. 3, 201-214.
- McLauchlin, J. (1997). The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. A public health perspective. *Reviews in Medical Microbiology* 8, 1-14.
- McLauchlin, J. y Gilbert, R. J. (1990). *Listeria* in food. Report from the PHLS Committee on *Listeria* and listeriosis. *PHLS Microbiology Digest* 7, 54-55.
- McLauchlin, J., Hall, S. M., Velani, S. K. y Gilbert, R. J. (1991). Human listeriosis and pate - A possible association. *British Medical Journal* 303, 773-775.
- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J. y Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology* 92, 15-33.
- McMeekin, T. A., Presser, K., Ratkowsky, D., Ross, T., Salter, M. y Tienungoon, S. (2000). Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology* 55, 93-98.
- McNab, W. B. (1998). A general framework illustrating an approach to quantitative microbial food safety risk assessment. *Journal of Food Protection* 61, 1216-1228.
- Miettinen, M. K., Palmu, L., Bjorkroth, K. J. y Korkeala, H. (2001). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant, and retail level. *Journal of Food Protection* 64, 994-999.
- Minnesota Extension Service. (1990). Food, agriculture, and nutrition forum IV, food safety: developing communication strategies. University of Minnesota. Minneapolis, USA.
- Mitchell, R. (2002). Risk communication. *Cap. 8*. En: Brown M. y Stringer M. (eds.). *Microbiological risk assessment in food processing*. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, USA, pp. 155-171.

- Morgan, M. G. (1993). Risk analysis and management. *Scientific American* 269, 32-8.
- Morris, J. y Bate R. (1999). Fearing food: risk, health & environment. Butterworth-Heinemann. Oxford, UK.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A. y Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *Journal of Pathology and Bacteriology* 29, 407-439.
- NACMCF (The National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods). (1992). Hazard analysis and critical control point system. *International Journal of Food Microbiology* 16, 1-23.
- Nascimento, M. S., Silva, N., Catanozi, M. P. L. M. y Silva, K. C. (2003). Effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. *Journal of Food Protection* 66, 1697-1700.
- Nauta, M. J. (2002). Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? *International Journal of Food Microbiology* 73, 297-304.
- NFPA (National Food Processors Association), IFPA (International Fresh-cut Produce Association) y United Fresh Fruit & Vegetable Association. (2001). Field core practice. International Fresh-cut Produce Association.
- Nguyen-The, C. y Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34, 371-401.
- Nickelson, R., Luchansky J., Kaspar C. y Johnson.E. (1996). Update on dry fermented sausage *Escherichia coli* O157:H7 validation research. Research Report N° 11-316. Chicago: National Cattleman 's Beef Association. Chicago, USA.
- Nørrung, B., Andersen, J. K. y Schlundt, J. (1999). Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology* 53, 195-203.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., Giffel, M. T. y Weem, P. P. (1997). A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiology* 14, 143-151.
- Notermans, S. y Hoogenboom-Verdegaal, A. (1992). Existing and emerging foodborne diseases. *International Journal of Food Microbiology* 15, 197-205.

- Notermans, S. y Hoornstra, E. (2000). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in fish products: some general principles, mechanism of infection and the use of performance standards to control human exposure. *International Journal of Food Microbiology* 62, 223-229.
- Notermans, S. y Mead, G. C. (1996). Incorporation of elements of quantitative risk analysis in the HACCP system. *International Journal of Food Microbiology* 30, 157-173.
- Park, C. M., Hung, Y. C., Doyle, M. P., Ezeike, G. O. I. y Kim, C. (2001). Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing and acidified chlorinated water. *Journal of Food Science* 66, 1368-1372.
- Park, H., Hung, Y. C. y Chung, D. (2004). Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 91, 13-18.
- Pérez-Rodríguez, F., van Asselt, E. D., García-Gimeno, R. M., Zurera, G. y Zwietering, M. H. (2007). Extracting risk managers information from a risk assessment of *Listeria monocytogenes* in deli meats. *Journal of Food Protection* 70, 1137-1152.
- Petran, R. L., Zottola, E. A. y Gravani, R. B. (1988). Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Science* 53, 1238-1240.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F. y Alige, S. (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 55, 121-126.
- Pin, C., García de Fernando, G. D., Ordóñez, J. A. y Baranyi, J. (2001). Applying a generalized z-value concept to quantify and compare the effect of environmental factors on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 18, 539-545.
- Pinner, R. W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Deaver, K. A., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D., Reeves, M., Broome, C. V. y Wenger, J. D. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis .2. Microbiologic and epidemiologic investigation. *Jama-Journal of the American Medical Association* 267, 2046-2050.
- Pirovani, M., Piagentini, A., Guemes, D. y Arkwright, S. (2004). Reduction of chlorine concentration and microbial load during washing-disinfection of

- shredded lettuce. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 341-347.
- Portnoy, D. A., Chakraborty, T., Goebel, W. y Cossart, P. (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infection and Immunity* 60, 1263-1267.
- Presser, K. A., Ross, T. y Ratkowsky, D. A. (1998). Modelling the growth limits (growth no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1773-1779.
- Ragaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F. y Debevere, J. (2004). Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality and Preference* 15, 259-270.
- Ransom, G. (2005). Considerations for establishing safety-based consume-by date labels for refrigerated ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection* 68, 1761-1775.
- Ratkowsky, D. A. (2004). Model fitting and uncertainty. *Cap. 4*. En: McKellar R. C. y Lu X. (eds.). *Modeling microbial responses in foods*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, pp. 151-196.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A. y Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth-rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* 149, 1-5.
- Ratkowsky, D. A. y Ross, T. (1995). Modeling the bacterial-growth no growth interface. *Letters in Applied Microbiology* 20, 29-33.
- Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. *Boletín Oficial del Estado* Nº 11 (12 enero 2001), pp. 1435-1441
- Real Decreto 202/2000, de 11 de febrero, por el que se establecen las normas relativas a los manipuladores de alimentos. *Boletín Oficial del Estado* Nº 48 (25 febrero 2000), pp. 8294-8297.
- Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos. *Boletín Oficial del Estado* Nº 237 (1 octubre 2004), pp. 32772-32777.

- Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, por el que se regulan los estudios universitarios oficiales de Posgrado. *Boletín Oficial del Estado* N° 21 (25 enero 2005), pp. 2846-2851.
- Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* (1 febrero 2001), L31.
- Reglamento (CE) N° 852/2004 DEL Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* (30 abril 2004), L139.
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* (22 diciembre 2005), L338.
- Rocourt, J. (1996). Risk factors for listeriosis. *Food Control* 7, 195-202.
- Rocourt, J. (1994). *Listeria monocytogenes*, the state of the science. *Dairy Food and Environmental Sanitation* 14, 70-82.
- Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H. y Schlundt, J. (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 35, 263-267.
- Rocourt, J. y Cossart, P. (2001). *Listeria monocytogenes*. Cap. 18. En: Doyle M. P., Beuchat L. R. y Montville T. J. (eds.). *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Acribia. Zaragoza, España, pp. 355-370.
- Rodgers, S. L., Cash, J. N., Siddiq, M. y Ryser, E. T. (2004). A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *Journal of Food Protection* 67, 721-731.
- Rosenblum, L. S., Mirkin, I. R., Allen, D. T., Safford, S. y Hadler, S. C. (1990). A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *American Journal of Public Health* 80, 1075-1079.
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.

- Ross, T., Dalgaard, P. y Tienungoon, S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 231-245.
- Ross, T. y McMeekin, T. A. (1995). Predictive microbiology and HACCP. Cap. 13. En: Pearson A. M. y Dutson T. R. (eds.). HACCP in meat, poultry and fish processing. Advances in meat research series. Blackie Academic & Professional. Glasgow, UK, pp. 331-357.
- Ross, T. y McMeekin, T. A. (2003). Modeling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Analysis* 23, 179-197.
- Ross, T. y Sumner, J. (2002). A simple, spreadsheet-based, food safety risk assessment tool. *International Journal of Food Microbiology* 77, 39-53.
- Roura, S. I., Moreira, M. D., Ponce, A. y Del Valle, C. E. (2003). Dip treatments for fresh Romaine lettuce. *Italian Journal of Food Science* 15, 405-415.
- Ryder, E. J. (1981). Sea green lettuce. *Hortscience* 16, 571-572.
- Sagoo, S. K., Little, C. L. y Mitchell, R. T. (2003). Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: Effectiveness of food hygiene training of management. *Journal of Food Protection* 66, 1581-1586.
- Salamina, G., Donne, E. D., Niccolini, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., Fini, R., Maldini, M., Schuchat, A., Swaminathan, B., Bibb, W., Rocourt, J., Binkin, N. y Salmaso, S. (1996). A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiology and Infection* 117, 429-436.
- Salter, M. A., Ratkowsky, D. A., Ross, T. y McMeekin, T. A. (2000). Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International Journal of Food Microbiology* 61, 159-167.
- Sapers, G. M., Gorny J. R. y Yousef A. E. (2006). Microbiology of fruits and vegetables. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Schaffner, D. W. (2004). Models - What comes after the next generation? Cap. 10. En: McKellar R. C. y Lu X. (eds.). Modeling microbial responses in foods. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, pp. 303-311.
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. y Broome, C.

- V. (1983). Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 308, 203-206.
- Schlimme, D. V. y Rooney, M. L. (1994). Packaging of minimally processed fruits and vegetables. *Cap. 4. En: Wiley R. C. (ed.). Minimally Processed Refrigerated Fruits&Vegetables. Chapman & Hall. New York, USA, pp. 135-182.*
- Schuchat, A., Deaver, K., Hayes, P. S., Graves, L., Mascola, L. y Wenger, J. D. (1993). Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *Journal of Infectious Diseases*, 167, 1261-1262.
- Scott, V. N., Swanson, K. M. J., Freier, T. A., Payton Pruett, W. J. R., Sveum, W. H., Hall, P. A., Smoot, L. A. y Brown, D. G. (2005). Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food Protection Trends* 25, 818-825.
- SCF (Scientific Committee on Food). (2000). Opinion of the Scientific Committee on Food in respect of *Listeria monocytogenes*. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Disponible en: http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out63_en.pdf.
- SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health). (1999). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Listeria monocytogenes*. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Disponible en: http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf.
- Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, P. y Genigeorgis, C. (1997). Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *International Journal of Food Microbiology* 34, 171-177.
- Sheehan, B., Kocks, C., Dramsi, S., Gouin, E., Klarsfeld, A., Mengaud, J. y Cossart, P. (1994). Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Current topics in microbiology and immunology* 192, 187-216.
- Sizmur, K. y Walker, C. W. (1988). *Listeria* in prepacked salads. *Lancet* 1, 1167-1167.
- Slovic, P. (1987). Perception of risk. *Science* 236, 280-285.

- Solomon, E. B., Pang, H. J. y Matthews, K. R. (2003). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water. *Journal of Food Protection* 66, 2198-2202.
- Solomon, H. M., Kautter, D. A., Lilly, T. y Rhodehamel, E. J. (1990). Outgrowth of *Clostridium botulinum* in shredded cabbage at room temperature under modified atmosphere. *Journal of Food Protection* 53, 831-833.
- Solomos, T. (1994). Some biological and physical principles underlying modified atmosphere packaging. Cap. 5. En: Wiley R. C. (ed.). Minimally Processed Refrigerated Fruits & Vegetables. Chapman & Hall. New York, USA, pp. 183-225.
- Steinbruegge, E. G., Maxcy, R. B. y Liewen, M. B. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. *Journal of Food Protection* 51, 596-599.
- Stephens, P. J., Joynson, J. A., Davies, K. W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H. M. y Humphrey, T. J. (1997). The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat injured *Salmonella* cells. *Journal of Applied Microbiology* 83, 445-455.
- Stringer, M. (2005). Food safety objectives - Role in microbiological food safety management. *Food Control* 16, 775-794.
- Szabo, E. A., Scurrah, K. J. y Burrows, J. M. (2000). Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *Letters in Applied Microbiology* 30, 456-460.
- Szabo, E. A., Simons, L., Coventry, M. J. y Cole, M. B. (2003). Assessment of control measures to achieve a food safety objective of less than 100 CFU of *Listeria monocytogenes* per gram at the point of consumption for fresh pre-cut iceberg lettuce. *Journal of Food Protection* 66, 256-264.
- Takeuchi, K. y Frank, J. F. (2000). Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *Journal of Food Protection* 63, 434-440.
- Takeuchi, K., Matute, C. M., Hassan, A. N. y Frank, J. F. (2000). Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *Journal of Food Protection* 63, 1433-1437.

- Tang, M. Y., Cheong, Y. M. y Zainuldin, T. (1994). Incidence of *Listeria* spp. in vegetables in Kuala Lumpur. *Medical Journal of Malasya* 49, 217-222.
- Tappero, J. W., Schuchat, A., Deaver, K. A., Mascola, L. y Wenger, J. D. (1995). Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States - Effectiveness of prevention efforts. *Jama-Journal of the American Medical Association* 273, 1118-1122.
- Teunis, P. F. M., van der Heijden O. G., van der Geissen J. W. B. y Havelaar A. H. (1996). The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens. Report 284550002. National Institute of Public Health and Environment. Bilthoven, Holanda.
- Thevenot, D., ignette-Muller, M. L., Christieans, S. y Vernozy-Rozand, C. (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology* 102, 85-94.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A. y Ross, T. (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4979-4987.
- Tilney, L. G. y Tilney, M. S. (1993). The wily ways of parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. *Trends in microbiology* 1, 25-31.
- Todd, E. C. D. y Harwig, J. (1996). Microbial risk analysis of food in Canada. *Journal of Food Protection* 10-18.
- Todd, E. C. D. y Roberts T. (1996). Approaches to estimating the benefits and costs of foodborne disease control choices. WHO Consultation on Costs and Preharvest Treatment of Animals. 8-10 junio 1995. Washington, D.C., USA.
- Trautman, T. D. (2001). Risk communication - The perceptions and realities. *Food Additives and Contaminants* 18, 1130-1134.
- U.S.Department of Agriculture. (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. U. S. Department of Agriculture, Food and Drug Administration, Food Safety and Applied Nutrition, Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.

- U.S. Food and Drug Administration (1997). Milk and cream, pasteurized, Code of Federal Regulations. 21 CFR 131.3b. Government Printing Office. Washington, USA.
- Valero, A., Carrasco, E., Perez-Rodriguez, F., Garcia-Gimeno, R. M., Blanco, C. y Zurera, G. (2006). Monitoring the sensorial and microbiological quality of pasteurized white asparagus at different storage temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 1281-1288.
- van Gerwen, S. J. C., de Wit, J. C., Notermans, S. y Zwietering, M. H. (1997). An identification procedure for foodborne microbial hazards. *International Journal of Food Microbiology* 38, 1-15.
- van Gerwen, S. J. C., te Giffel, M. C., van 't Riet, K., Beumer, R. R. y Zwietering, M. H. (2000). Stepwise quantitative risk assessment as a tool for characterization of microbiological food safety. *Journal of Applied Microbiology* 88, 938-951.
- van Gerwen, S. J. C. y Zwietering, M. H. (1998). Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *Journal of Food Protection* 61, 1541-1549.
- van Schothorst, M. (1997). Practical approaches to risk assessment. *Journal of Food Protection* 60, 1439-1443.
- van Schothorst, M. (1994). Choice of sampling plan and criteria for *Listeria monocytogenes* - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *International Journal of Food Microbiology* 22, 89-96.
- Vaz, M. L. S., Novo, N. F., Sigulem, D. M. y Morais, T. B. (2005). A training course on food hygiene for butchers: Measuring its effectiveness through microbiological analysis and the use of an inspection checklist. *Journal of Food Protection* 68, 2439-2442.
- Velani, S. y Roberts, D. (1991). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in prepacked salad mixes and individual salad ingredients. *PHLS Microbiology digest* 8, 21-22.
- Vitas, A. I., Aguado, V. y Garcia-Jalon, I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 90, 349-356.
- Vose, D. (2000). Risk analysis. A quantitative guide, 2ª edición. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England, UK.

- Vose, D. J. (1998). The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *Journal of Food Protection* 61, 640-648.
- Wachtel, M. R., Whitehand, L. C. y Mandrell, R. E. (2002a). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection* 65, 18-25.
- Wachtel, M. R., Whitehand, L. C. y Mandrell, R. E. (2002b). Prevalence of *Escherichia coli* associated with a cabbage crop inadvertently irrigated with partially treated sewage wastewater. *Journal of Food Protection* 65, 471-475.
- Walls, I. (2005). Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - A risk-based approach. *Journal of Food Protection* 68, 1932-1994.
- Wansink, B. y Wright, A. O. (2006). "Best if used by..." How freshness dating influences food acceptance. *Journal of Food Science* 71, S354-S357.
- Warton, M. A. y Wills, R. B. H. (2002). Survey of storage conditions and quality of minimally processed packaged lettuce in supermarkets. *Food Australia* 54, 191-192.
- Weis, J. y Seeliger, H. P. R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology* 30, 29-32.
- Wells, J. M. y Butterfield, J. E. (1997). *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace. *Plant Disease* 81, 867-872.
- Werner, B. G. y Hotchkiss, J. H. (2006). Modified atmosphere packaging. *Cap. 19*. En: Sapers G. M., Gorny J. R. y Yousef A. E. (eds.). *Microbiology of Fruits and Vegetables*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, pp. 437-460.
- Wheeler, J. G., Sethi, D., Cowden, J. M., Wall, P. G., Rodrigues, L. C., Tompkins, D. S., Hudson, M. J. y Roderick, P. J. (1999). Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *British Medical Journal* 318, 1046-1050.
- Whiting, R. C. y Buchanan, R. L. (1997). Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology* 36, 111-125.
- Wiley, R. C. (1994b). Preservation methods for minimally processed refrigerated fruits and vegetables. *Cap. 3*. En: Wiley R. C. (ed.). *Minimally Processed*

- Refrigerated Fruits & Vegetables. Chapman & Hall. New York, USA, pp. 66-133.
- Wiley, R. C. (1994a). Minimally processed refrigerated fruits & vegetables. Chapman & Hall. New York, USA.
- Wilcox, F., Hendrickx, M. y Tobback, P. (1993). Temperatures in the distribution chain. 80-99.
- Wilson, R. y Crouch, E. A. (2001). Risk and risk perception. *Cap. 1*. En: Wilson R. y Crouch E. A. (eds.). Risk-benefit analysis. Harvard University Press. Cambridge, UK, pp. 1-24.
- WTO (World Trade Organization) (1995). The WTO agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures (SPS Agreement). Disponible en: http://www.wto.org/english/tratop_e/sps_e/spsagr_e.htm.
- Zagory, D. (1999). Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology* 15, 313-321.
- Zhang, L. K., Lu, Z. X., Lu, F. X. y Bie, X. M. (2006). Effect of gamma irradiation on quality-maintaining of fresh-cut lettuce. *Food Control* 17, 225-228.
- Zhang, S. y Farber, J. M. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology* 13, 311-321.
- Zwietering, M. H., Dewit, J. C. y Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.

