



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

APLICACIÓN DEL PROGRAMA SQMRAv2 PARA CARACTERIZAR EL RIESGO DE Listeria monocytogenes EN PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA SU CONSUMO

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD
Y CALIDAD ALIMENTARIA.

ALUMNA: Isabel María Bascón Villegas.

TUTOR ACADEMICO: Antonio Martínez López.

COTUTOR: Alejandro Rivas Soler

Curso Académico: 2015/2016

VALENCIA, 30 de Junio del 2016

APLICACIÓN DEL PROGRAMA SQMRAv2 PARA CARACTERIZAR EL RIESGO DE *Listeria monocytogenes* EN PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA SU CONSUMO

Isabel Bascón Villegas, Antonio Martínez López¹, Alejandro Rivas Soler¹

RESUMEN

Actualmente la evaluación de riesgos está evolucionando hacia el desarrollo de programas de ordenador que permitan una evaluación semicuantitativa del riesgo microbiológico en alimentos. En este sentido se puede encontrar diferentes programas que permiten hacer este tipo de aproximaciones. Las ventajas de estos programas es que permiten hacer una evaluación relativa del riesgo y por tanto priorizar la adjudicación de los recursos económicos en una gestión del riesgo, a un coste inferior que el ocasionado si se pretende llevar a cabo una evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico. Por otro lado dan una información más útil que la meramente cualitativa.

ABSTRACT

Risk assessment is evolving towards the development of computer programs that enable a semi-quantitative assessment of microbiological risks in food. In this sense, different programs that allow this type of approach can be found. The advantages of these programs are that they allow making a relative assessment of the risk and therefore prioritizing the award of economic resources in a risk management, at a lower cost than the caused if intends to carry out a quantitative microbiological risk evaluation. On the other hand, it gives more useful information than the simply qualitative information.

RESUMN

Actualment l'avaluació de riscos està evolucionant cap al desenvolupament de programes d'ordinador que permeten una avaluació semicuantitativa del risc microbiològic en aliments. En este sentit es poden trobar diferents programes que permeten fer este tipus d'aproximacions. Els avantatges d'estos programes és que permeten fer una avaluació relativa del risc i per tant prioritzar l'adjudicació dels recursos econòmics en una gestió del risc, a un cost inferior que l'ocasionat si es pretén dur a terme una avaluació quantitativa del risc microbiològic. D'altra banda donen una informació més útil que la merament qualitativa.

PALABRAS CLAVE: Evaluación de riesgos, software, *Listeria monocytogenes*, productos cárnicos listos para el consumo.

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA – CSIC), Avda. Agustín Escardino, 7, 46980 Paterna (Valencia), España.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo (LPC)

En los últimos años, con el avance tecnológico en las industrias alimentarias y los canales de distribución de alimentos, se han incrementado la producción y venta de alimentos LPC. Según la FAO, un alimento LPC se define como cualquier alimento que se consuma normalmente sin cocinar o cualquier alimento manipulado, elaborado, mezclado, cocido o preparado de otra manera, que se consuma normalmente sin ninguna manipulación posterior. Aunque diversos alimentos pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, los brotes y los casos esporádicos de listeriosis están predominantemente asociados a alimentos LPC (FAO, 2004; USDA, 2003). Estudios científicos indican que los derivados cárnicos LPC son productos de alto riesgo debido a que *L. monocytogenes* puede sobrevivir e incluso crecer (Gallagher *et al.*, 2003) y no se someten a ningún tratamiento tecnológico que asegure la destrucción del patógeno antes del consumo (AFSSA, 2008).

1.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria gram-positiva y anaerobia facultativa. Es uno de los principales patógenos encontrados en los alimentos. Por su ubicuidad, se encuentra frecuentemente en las plantas de producción de alimentos, en las cuales es muy difícil controlarla por las características fisiológicas que posee, que le permiten crecer y sobrevivir durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, además de presentar una especial resistencia a los tratamientos bactericidas utilizados normalmente en la industria alimentaria, por la formación de biofilms.

Uno de los factores más importantes que promueven la colonización en las plantas de procesado es su adhesión a una amplia gama de superficies como el acero inoxidable, goma, cristal y polipropileno (Lunden *et al.*, 2000). *L. monocytogenes* es capaz de formar biofilms (comunidad microbiana sésil, donde las células se unen de manera irreversible al sustrato, interfaz o entre sí y son embebidas en la matriz de un sustrato polimérico extracelular) (Donlan *et al.*, 2002). Esta matriz exopolisacárida es un obstáculo para la interacción de biocidas, ya que protege a las células de la acción de los higienizantes, en algunas ocasiones promueve la resistencia antimicrobiana (Vaid *et al.*, 2010).

Cabe decir que tanto las características del material de los equipos y utensilios utilizados, el pH y la temperatura a la que se elaboran los alimentos, así como la a_w y la concentración de NaCl presente en el producto, pueden influir en dicha adhesión microbiana (F.J. Pérez *et al.*, 1999). (Tabla 1)

Tabla 1.- Factores que afectan al crecimiento de *L. monocytogenes*.

	Supervivencia	Crecimiento		
		Mínimo	Óptimo	Máximo
T ^a (°C)	*	-1,5	30 - 37	45
pH	≤ 4,3	4,39		9,40
a _w	≥ 0,83	0,92	≥ 0,97	
% NaCl	≥ 12			12-16

Al ser la contaminación de los alimentos una constante, bien sea a través de las superficies en contacto con el alimento, o por medio de manipuladores resulta imperativo realizar programas eficientes de limpieza y desinfección en la industria (Holah *et al.*, 1994).

Además de su resistencia a condiciones adversas, la razón por la que este patógeno es considerado de especial importancia, tanto para la industria alimentaria como para los organismos de salud pública, es el elevado índice de mortalidad que produce y su capacidad para sobrevivir en condiciones adversas.

La listeriosis es la infección causada por *L. monocytogenes*. Se puede manifestar de dos formas, invasiva y no invasiva. La forma invasiva se suele presentar en ancianos, niños, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas; dando lugar a meningitis, abortos y septicemia, entre otros, con una tasa de mortalidad del 20 al 30% de los casos. La forma no invasiva se ha observado en algunos brotes de origen alimentario, donde la mayoría de los casos presentan síntomas de gastroenteritis tras un período de incubación corto. Esta última puede afectar a toda la población y normalmente se soluciona de manera espontánea (Torres *et al.* 2004, Torres *et al.* 2005).

En España, los casos de listeriosis notificados al Sistema de Información Microbiológica (SIM) en el periodo de 2010 al 2014 están comprendidos entre 114 y 150. Sin embargo, a partir de la Orden SSI/445/2015, la listeriosis humana pasa a ser una enfermedad de declaración obligatoria, por lo el número de casos notificados podría verse aumentado.

Existe controversia a nivel internacional sobre los criterios microbiológicos de *L. monocytogenes* en alimentos LPC. De acuerdo al Reglamento (CE) 2073/2005, basado en las sugerencias del Codex Alimentarius, se establece una concentración máxima de 100 ufc/g para alimentos LPC no destinados a población susceptible (niños, embarazadas, ancianos e inmunodeprimidos), siempre y cuando este nivel no se supere durante el proceso de conservación del alimento, o, ausencia en 25 g del alimento en caso de que no se pueda garantizar la ausencia de crecimiento microbiano durante el proceso de conservación. EEUU, Reino Unido y Japón han evolucionado desde el criterio "tolerancia cero" (ausencia en 25 g) en cuanto a la presencia de *L. monocytogenes* en cualquier alimento LPC hasta criterios de 100 ufc/g para alimentos LPC que no permitan el crecimiento de *L. monocytogenes*; e incluso la adopción del criterio sugerido por el Codex en el caso de Japón.

1.3. Clasificación de riesgos

La Evaluación de Riesgos Microbiológicos Cuantitativa (QRMA) describe, mediante técnicas de modelización matemática, la propagación de un microorganismo patógeno desde la granja hasta el consumidor final. Es un método valioso para evaluar los efectos de las medidas de control sobre el riesgo de una combinación alimento-patógeno, desde el punto de vista económico y de salud pública. Sin embargo, su desarrollo requiere mucho tiempo, gran cantidad de datos y amplios conocimientos. Por tanto, en algunos casos es preferible y suficiente el uso de un modelo simplificado, obteniéndose una reducción de tiempo y costes en las estimaciones.

Se han desarrollado herramientas informáticas que permiten realizar evaluaciones de riesgos comparativas, obteniéndose una estimación del riesgo relativo (frente a un valor de referencia) de una combinación patógeno-alimento (Evers *et al.*, 2010). La obtención de resultados expresados como riesgos relativos tiene sentido en la aplicación de modelos simplificados, ya que, incluso ni en el caso de modelos QRMA, los valores absolutos son fiables debido fundamentalmente a la incertidumbre asociada a la información de que se dispone.

La clasificación del riesgo microbiológico es un proceso científico coherente, exhaustivo, transparente y basado en la evidencia para priorizar y evaluar los riesgos asociados a los peligros biológicos en los alimentos. Su objetivo es apoyar a los gestores en la toma de decisión para prevenir y controlar los riesgos para la salud. Dicha clasificación es un punto de partida para el establecimiento de prioridades y la asignación de recursos basados en el riesgo, ya que permitiría a las autoridades sanitarias centrar la atención en los problemas más importantes de salud pública y así poder desarrollar estrategias adecuadas para abordarlos.

Debido a su importancia, la prioridad en la clasificación de riesgos se ha establecido como un componente importante de los marcos de gestión de riesgos. En el contexto de que la evaluación de riesgos es un pilar de las políticas de seguridad alimentaria, las autoridades sanitarias de los estados miembros de la UE han empezado a considerar la clasificación de riesgos como un medio para establecer esas prioridades. La EFSA, dentro de su Estrategia General de la Ciencia (2012-2016) le ha dado importancia a la clasificación de riesgos llevando a cabo diferentes acciones, con la participación de diferentes unidades de la EFSA, como el de los Peligros y Contaminantes Unidad Biológica (BIOCONTAM) y el Comité Científico y Surgimiento de la Unidad de Riesgos.

1.4. Objetivos

- 1) Evaluar el riesgo relativo en el consumo de jamón cocido respecto a *Listeria monocytogenes* considerando dos escenarios, punto de venta y la cocina doméstica.
- 2) Evaluar la aplicación del SQMRAv2 como herramienta para llevar a cabo evaluaciones de riesgo haciendo uso de simulación Monte Carlo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se va a llevar a cabo una evaluación de riesgos considerando dos escenarios. En el primer escenario se evalúa un jamón cocido en el punto de venta. El segundo escenario considera jamón cocido manipulado (sometido a diferentes condiciones culinarias) en el hogar. Para ello se tendrá en cuenta la posible contaminación cruzada y las prácticas culinarias.

Herramientas utilizadas

Las simulaciones en esta evaluación de riesgos se han llevado a cabo mediante el software SQMRAv2 (Swift Quantitative Microbiological Risk Assessment versión 2). Esta herramienta se incorpora como una hoja de cálculo en el programa @RISK, programa que permite realizar simulaciones Monte Carlo. La evaluación de riesgos realizada por el SQMRAv2 indica la probabilidad de que se produzca un determinado resultado y los riesgos asociados con cada uno de ellos.

La simulación Monte Carlo es una técnica cuantitativa que hace uso de la estadística y de la potencia de los ordenadores para imitar, mediante modelos matemáticos, el comportamiento aleatorio de procesos reales no dinámicos (Rivas, 2014). La clave de la simulación consiste en crear un modelo matemático del proceso que se quiere analizar, identificando las variables de entrada (inputs) cuyo comportamiento aleatorio determina el comportamiento global del proceso. Básicamente consiste en:

- Generar valores concretos para dichos inputs.
- Analizar el comportamiento del proceso ante los valores generados.

Tras repetir “n” veces el proceso, se dispondrá de “n” observaciones sobre el comportamiento del mismo, lo cual nos será de utilidad para entender su funcionamiento.

A nivel general, la evaluación de riesgos realizada por SQMRA sigue la propagación de un agente patógeno, a partir de la fase de venta al por menor; considerando entre otros, los procesos de:

- Almacenamiento.
- Contaminación cruzada.
- Preparación en el hogar.

El dato de salida de una etapa, teniendo en cuenta los procesos anteriores, supone el valor de entrada (input) para la siguiente etapa del análisis. La herramienta expresa el riesgo en términos de infección, enfermedad, DALY y costes de la enfermedad, tanto a nivel de población como de porción del producto (Figura 1).



Figura 1.- Descripción del modelo de SQMRAv2

En el presente estudio, se han considerado los siguientes datos de entrada (inputs): datos de consumo, condiciones de almacenamiento, contaminación cruzada, tratamiento térmico realizado en el hogar e infección y enfermedad; los cuales se subdividen a su vez en los siguientes subapartados:

ÁMBITO DE TRABAJO.

En este apartado, se especifica el patógeno de interés (*Listeria monocytogenes*), el producto de estudio (jamón cocido), la población específica, que en este caso se considera el total de la población española y el tamaño de la misma en el año 2014 que es 46.771.341 habitantes (INE, 2016); y por último el periodo de consumo que se estableció en 365 días. Se consideró la población total porque los productos cárnicos cocidos, y en particular el jamón cocido, es un tipo de alimento que puede ser consumido por toda la población, independientemente de su edad y de su estado fisiológico.

PORCIONES CONSUMIDAS.

El programa necesita como dato de entrada las porciones consumidas por mes y consumidor. A partir de la información de consumo por habitante de jamón cocido que proporciona el MAGRAMA, se ha calculado que se consumieron 0,93 porciones por persona y mes, en el año 2014; considerando que cada porción son 100 gramos de jamón cocido.

PREVALENCIA DEL PATÓGENO.

Se evalúa el efecto de la variación de este input considerando el porcentaje de porciones contaminadas (prevalencia) en el punto de venta. Para ello se ha

utilizado información científica y de base de datos de organismos públicos (Iannetti *et al.* (2016); Garrido *et al.* (2009); Cabedo *et al.* (2008)).

CONCENTRACIÓN DEL PATÓGENO.

La concentración de *L. monocytogenes* en las porciones contaminadas se expresa como \log_{10} ufc/g. En este trabajo no se considera un valor fijo para dicho input, variará en función del escenario considerado.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.

En este apartado la herramienta SQMRA contempla el porcentaje de porciones que se almacenan en cada categoría de temperatura (T^a ambiente, frigorífico o congelador). En el presente trabajo se ha considerado que todo el producto se mantiene en refrigeración. El tiempo medio de almacenamiento del producto se establece como 72 horas; el tiempo medio máximo de almacenamiento se establece como 168 horas; y por último la temperatura de almacenamiento considerada varía entre 4°C y 10°C en función del escenario estudiado.

CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO E INACTIVACIÓN DEL PATÓGENO.

En este apartado se introduce: (a) el tiempo mínimo de generación del patógeno en el producto (horas), calculado con la herramienta online "ComBase" según el tipo de escenario estudiado; (b) la temperatura óptima de crecimiento (37°C); (c) la temperatura mínima de crecimiento (0°C); y (d) la densidad máxima de la población microbiana en el alimento $1,0 \times 10^9$ ufc/g.

PARÁMETROS DE CONTAMINACIÓN CRUZADA.

La contaminación cruzada es el proceso mediante el cual un alimento entra en contacto con una sustancia, alimento y/o utensilio contaminado, y se contamina a causa de dicho contacto. En este apartado es necesario establecer el porcentaje de porciones contaminadas de cualquier alimento que pueden causar contaminación cruzada en el jamón cocido y la concentración de microorganismos (\log_{10} ufc/g) que contiene la porción de producto que se va a consumir. Se considerará que existe contaminación cruzada en función del escenario a estudiar.

PREPARACIÓN DEL ALIMENTO.

Se tiene en cuenta el porcentaje de porciones que se encuentran listas para su consumo, semielaboradas y elaboradas. Este porcentaje variará en función del escenario estudiado.

PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA DURANTE EL TRATAMIENTO TÉRMICO EN EL HOGAR.

La herramienta considera un modelo de inactivación térmica (DRT/z). Los datos requeridos sobre los parámetros de resistencia térmica de *L.*

monocytogenes en alimentos, se obtuvieron de la guía elaborada por la Campden and Chorlewood Food Research Association sobre la pasteurización de los alimentos.

Tabla 2.- Parámetros de resistencia de *L.monocytogenes* en carnes.

Matriz	Valor DR _T (min)	Valor Z (°C)
Carnes	D ₅₅ =8,15-36,91	5,05-7,39
	D ₆₀ =0,99-8,32	
	D ₆₅ =0,48-1,41	
	D ₇₀ =0,0063-0,2	

DR_T: Tiempo a una determinada temperatura necesario para reducir en un 90% (una reducción logarítmica) el número de células vegetativas.

Z: Incremento de temperatura necesario para reducir el valor DR_T en un 90%.

PARÁMETROS DEL MODELO DOSIS-RESPUESTA.

El sQRMA usa dos tipos de modelos dosis-respuesta, el modelo binomial y el modelo beta-binomial. En este trabajo se ha usado el modelo binomial, que es un modelo determinista definido por la concentración de microorganismo (d) y por la probabilidad de enfermar al consumir una ufc del patógeno (r) (Ec.1). El parámetro r define la forma de la curva y depende del microorganismo y del tipo de población (total, inmunodeprimidas, embarazadas, etc).

El valor de r se ha calculado según el estudio de Robert L. Buchanan *et al.* (1997) dando como resultado $2,86 \times 10^{-10}$, considerando el total de la población consumidora.

$$p_{resp} = 1 - (1 - r)^{d_{pr}} \quad \text{Ec.1}$$

PROBABILIDAD DE ENFERMEDAD DADA LA INFECCIÓN.

La probabilidad de enfermar habiendo consumido un alimento contaminado con *L. monocytogenes* se considera en un 90% (FDA/FSIS, 2003).

DALY POR CASO.

Se define DALY (Disability-Adjusted Life Year) como la pérdida de vida en comparación con el estado de salud perfecto en función del tiempo. Cuya ecuación es:

$$\text{DALY} = \text{YLL} + \text{YLD}, \quad \text{Ec.2}$$

Siendo YLL el número de años de vida saludable perdidos por mortalidad prematura; e YLD el número de años perdidos por discapacidad. Para el estudio se ha calculado un DALY por caso de 29,30 (casos de listeriosis notificados en España), siendo un valor semejante al de otros países occidentales (Scallan *et al.*, 2015).

COSTES DE LA ENFERMEDAD POR CASO.

El coste de la enfermedad es un parámetro económico que no solo considera los costes sanitarios de la enfermedad (consultas, hospitalización, medicación, etc) sino que además consideran otros costes no sanitarios

(desplazamientos, pérdida de horas de trabajo, etc). Según un informe de USDA en el año 2014, los costes de la enfermedad causada por *L. monocytogenes*, listeriosis, supone para Estados Unidos (EEUU) un coste de 2700 millones de dólares para una casuística de 2.834 casos. En España el número de casos de listeriosis notificados es muy similar al de EEUU, y considerando que el coste unitario es similar al de EEUU, se ha estimado que el coste por caso de listeriosis en España supondría 847.918 €.

En los anteriores subapartados se introducen los datos de entrada (inputs), los cuales son procesados por la herramienta, obteniéndose así unos datos de salida (outputs), que proporcionan una estimación del número de porciones contaminadas a nivel minorista, en el almacenamiento y en la preparación; el número de ufc (unidades formadoras de colonias) a nivel minorista, en el almacenamiento y en la preparación; el número de infecciones producidas por el patógeno de interés, el número de casos ocurridos, DALY por caso y los costes ocasionados por cada caso (COI).

La herramienta permite realizar dos análisis avanzados: análisis de sensibilidad y Goal Seek. El primero permite estudiar como la incertidumbre de los outputs del modelo puede ser asignada a sus variables de entrada (inputs), y determinar de esta forma la influencia de estos inputs sobre los outputs. La herramienta Goal Seek permite estimar el valor de un input para obtener el valor del output previamente establecido.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Escenario 1.- Producto en el punto de venta.

Se evalúa al producto en el punto de venta, considerando buenas condiciones de manipulación y almacenamiento, sin tener en cuenta una posible contaminación cruzada, ni las condiciones a las que se somete al alimento en el hogar, se está hablando de un producto Listo Para Su Consumo.

En este escenario se evalúa el efecto de la variación de 3 parámetros de entrada (Inputs) con los que se realizarán las simulaciones: prevalencia, contaminación inicial y tiempo de generación. El resto de inputs se mantiene constante como se indica más abajo.

SIMULACIONES

Prevalencia

En primer lugar se realizó una búsqueda bibliográfica en artículos científicos para obtener datos de prevalencia de *L. monocytogenes* en jamón cocido a nivel industrial, observándose que los valores variaban entre el 1,2 y el 12,5%

(Iannetti *et al.* (2016); Garrido *et al.* (2009); Cabedo *et al.* (2008)). La variabilidad de la prevalencia puede deberse a las distintas condiciones a las que se encuentra sometido el producto y/o las diferentes metodologías de higienización realizadas. Se llevaron a cabo 3 simulaciones variando el valor de la prevalencia (Tabla 3), manteniendo constante tanto la concentración inicial (100 ufc/g, según el límite máximo legal establecido), como el tiempo de generación (62 horas, el cual se obtuvo mediante la herramienta ComBase). El resultado de las simulaciones se puede apreciar en la tabla 4.

Tabla 3.- Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en jamón cocido.

Simulación	Nº muestras	Muestras positivas	Prevalencia (%)	Referencia
1	326	4	1,23	L. Iannetti et al., 2016
2	200	9	4,5	V. Garrido et al., 2009
3	24	3	12,5	L. Cabedo et al., 2008

Tabla 4.- Estimación del número de enfermos a causa de *Listeria monocytogenes* en la población española, en función de la prevalencia.

RIESGO RELATIVO A NIVEL POBLACIONAL (por 100000 personas)			
	Simulación 1	Simulación 2	Simulación 3
Nº porciones contaminadas ^a	1,37E+04 (0,0984)	5,02E+04 (0,360)	1,40E+05 (1,00)
Nº ufc ^b	1,53E+08 (0,0988)	5,58E+08 (0,361)	1,54E+09 (1,00)
Número de infecciones	0,0440 (0,0988)	0,161 (0,361)	0,445 (1,00)
Número de casos	0,0396 (0,0988)	0,145 (0,361)	0,401 (1,00)
DALY población	1,16 (0,0988)	4,25 (0,361)	11,8 (1,00)
Costes población (€)	3,37E+04 (0,0988)	1,23E+05 (0,361)	3,41E+05 (1,00)

^a Número de porciones contaminadas a nivel de minorista, almacenamiento y preparación.

^b Número de ufc a nivel de minorista, almacenamiento y preparación.

Entre paréntesis se encuentran los resultados expresados como riesgo relativo en función del caso más desfavorable que en este estudio es el que presenta mayor prevalencia.

Como se observa en la tabla 4, a medida que aumenta la prevalencia de porciones con *L. monocytogenes*, aumenta el número de casos de listeriosis. Por tanto resulta fundamental evitar la contaminación del jamón cocido a nivel minorista, siguiendo unas buenas prácticas de manipulación.

Contaminación inicial

Se realizó una búsqueda bibliográfica en artículos científicos para obtener datos de concentración inicial teniendo en cuenta distintas metodologías de higienización con objeto de llevar a cabo las simulaciones (Tabla 5). Cualquier tratamiento de higienización de superficies de contacto con alimentos afecta al número de microorganismos presentes en el producto final. Se ha considerado que la transferencia de microorganismos entre la superficie en contacto con el jamón cocido y el propio alimento es del 100%. Se llevaron a cabo 4 simulaciones variando la contaminación inicial como valor de entrada,

manteniendo constante la prevalencia (12,5%) y el tiempo de generación (62 horas). Los resultados se pueden apreciar en la tabla 6.

Tabla 5.- Concentración inicial de *Listeria monocytogenes* en jamón cocido según el tratamiento de higienización realizado en la industria alimentaria.

Simulación	Tratamiento	Concentración (log ufc/g)	Referencia
1	Ninguno	8	
2	Agua electrolizada	4	B. Ayebah et al., 2006
3	Amonio cuaternario	2	J. Carballo et al., 2012
4	Ozono	1	J. B. Robbins et al., 2005

Tabla 6.- Estimación del número de enfermos a causa de *Listeria monocytogenes* en la población española, en función de la concentración inicial.

RIESGO RELATIVO A NIVEL POBLACIONAL (por 100000 personas)				
	Simulación 1	Simulación 2	Simulación 3	Simulación 4
Nº porciones contaminadas ^a	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)
Minorista (nº ufc)	1,02E+16 (1,00)	2,58E+11 (2,54E-05)	1,86E+09 (1,83E-07)	1,72E+08 (1,69E-08)
Almacenamiento (nº ufc)	4,34E+15 (1,00)	2,60E+11 (5,98E-05)	1,88E+09 (4,32E-07)	1,73E+08 (3,99E-08)
Preparación (nº ufc)	4,34E+15 (1,00)	2,60E+11 (5,98E-05)	1,88E+09 (4,32E-07)	1,73E+08 (3,99E-08)
Número de infecciones	1,28E+05 (1,00)	74,2 (5,80E-04)	0,537 (4,19E-06)	0,0495 (3,87E-07)
Número de casos	1,15E+05 (1,00)	66,8 (5,80E-04)	0,483 (4,19E-06)	0,0446 (3,87E-07)
DALY población	3,38E+06 (1,00)	1960 (5,80E-04)	14,2 (4,19E-06)	1,31 (3,87E-07)
Costes población (€)	9,79E+10 (1,00)	5,68E+07 (5,80E-04)	4,10E+05 (4,19E-06)	3,79E+04 (3,87E-07)

^a Número de porciones contaminadas a nivel de minorista, almacenamiento y preparación.

Entre paréntesis se encuentran los resultados expresados como riesgo relativo en función del caso más desfavorable que el que se refiere a ausencia de control.

Como se observa en la tabla 6, el número de casos de listeriosis disminuye a medida que disminuye la concentración inicial de *L. monocytogenes*. Según los resultados obtenidos, se evidencia la necesidad de llevar a cabo una buena estrategia de limpieza y desinfección, para inactivar al patógeno. A pesar de ello, los procedimientos y métodos actuales disponibles son insuficientes para lograr el control total de *L. monocytogenes* tanto en el alimento como en la planta de producción de alimentos, equipos y entornos relacionados (Carlton *et al.*, 2005). Por lo que hay una necesidad de desarrollar mejores métodos para el control de la contaminación.

Tiempo de generación

En este escenario, se ha evaluado el efecto de la disminución del tiempo de generación en la estimación de casos de listeriosis. Este parámetro lo usa el sQRMA para caracterizar el comportamiento del patógeno en el alimento. A través de él se puede evaluar el efecto de nitrito que es un conservante usado en este tipo de producto, jamón cocido. Para establecer el tiempo de generación se contó con la herramienta ComBase, la cual permite calcular dicho parámetro mediante una curva de crecimiento que tiene en cuenta el

microorganismo implicado y las condiciones de crecimiento del mismo (concentración inicial, pH, actividad de agua, temperatura y concentración de nitritos) (Tabla 7). Se llevaron a cabo 3 simulaciones, manteniendo constante la prevalencia (12,5%) y la concentración inicial de microorganismo (100 ufc/g) y variando la concentración de nitrito (Tabla 8).

Tabla 7.- Condiciones de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en jamón cocido.

Concentración inicial (log ufc/g)	2
Temperatura (°C)	4
pH	5,8
Actividad de agua (a _w)	0,97
Concentración nitritos (ppm)	150, 100, 50*

(*) Se hizo variar el contenido de nitritos (ppm) para comprobar como variaba el tiempo de generación en función de la concentración de nitritos. Estableciéndose como máximo el límite máximo permitido por la Directiva 2006/52/CE.

Tabla 8.- Tiempo de generación (horas) de *Listeria monocytogenes* en jamón cocido en función de la concentración de nitritos (ppm).

Simulación	[Nitritos] (ppm)	Tiempo generación (h)
1	150	69
2	100	55
3	50	44

Tabla 9.- Estimación del número de enfermos a causa de *Listeria monocytogenes* en la población española, en función del tiempo de generación.

RIESGO RELATIVO A NIVEL POBLACIONAL (por 100000 personas)			
	Simulación 1	Simulación 2	Simulación 3
Nº porciones contaminadas ^a	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)
Nº ufc ^b	1,86E+09 (1,00)	1,86E+09 (1,00)	1,86E+09 (1,00)
Número de infecciones	0,537 (1,00)	0,537 (1,00)	0,537 (1,00)
Número de casos	0,4833 (0,9992)	0,4836 (0,9997)	0,4837 (1,00)
DALY población	14,2 (1,00)	14,2 (1,00)	14,2 (1,00)
Costes población (€)	4,11E+05 (1,00)	4,11E+05 (1,00)	4,11E+05 (1,00)

^a Número de porciones contaminadas a nivel de minorista, almacenamiento y preparación.

^b Número de ufc a nivel de minorista, almacenamiento y preparación.

Entre paréntesis se encuentran los resultados expresados como riesgo relativo en función del caso más desfavorable que sería el producto con menos concentración de nitritos.

La tabla 9 muestra los resultados de las simulaciones. Como se puede observar, el número de casos de listeriosis no se ve afectado por la variación del tiempo de generación.

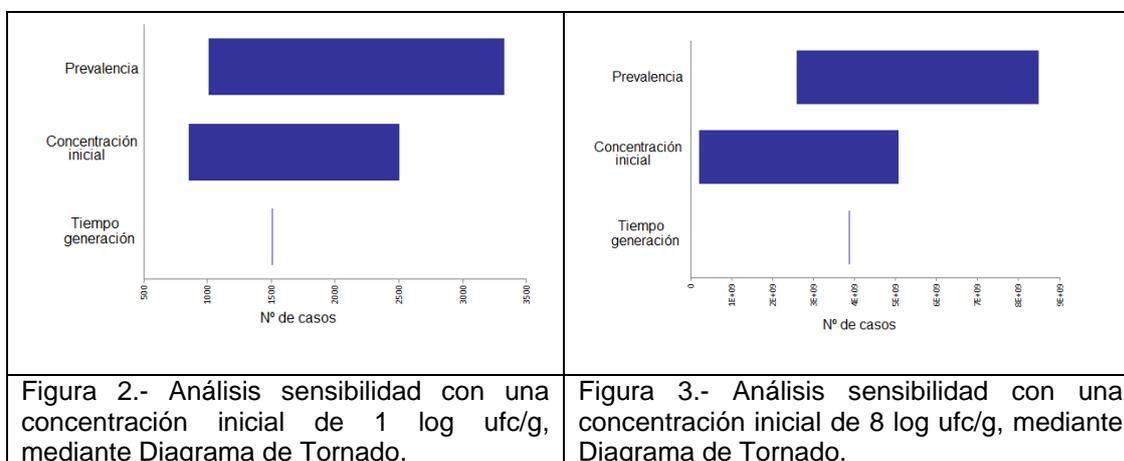
ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

Se ha realizado un análisis de sensibilidad en dos casos extremos relacionados con la concentración inicial (log ufc/g) de *Listeria monocytogenes* en el jamón cocido. En el primer caso se parte de una contaminación inicial de

$1 \pm 0,1$ log ufc/g; y el segundo se parte de una concentración inicial de $8 \pm 0,8$ log ufc/g.

Cada uno de los análisis realiza 21 simulaciones y 1000 iteraciones por simulación, por lo que las iteraciones totales son 21000.

Para el análisis de sensibilidad es necesario que los 3 parámetros considerados (prevalencia, contaminación inicial y tiempo de generación) se encuentren como una función de distribución. En el caso de la contaminación inicial el programa proporciona la función de distribución que se ajusta a este tipo de datos (función de distribución normal). Para los otros dos parámetros se ejecuta un “Best Fit”, obteniéndose que la prevalencia se ajusta a una exponencial [3,608; 7,1784] y el tiempo de generación a RiskExtvalue [46,95668; 0,39301].



Las figuras 2 y 3 muestran el resultado de los análisis de sensibilidad. Como se observa, la prevalencia es la variable que afecta en mayor medida en el riesgo, por tanto tiene un mayor efecto sobre el número de casos. En segundo lugar aparece la concentración inicial del patógeno, mientras que el tiempo de generación no tiene influencia.

ANÁLISIS GOAL SEEK

Con esta herramienta se pretende estimar qué prevalencia máxima se debería permitir para reducir en un 50% el número de casos de listeriosis provocados por *L. monocytogenes*. Para ello, se parte de una concentración inicial de 100 ufc/g (máxima permitida en alimentos en los que *L. monocytogenes* no puede crecer), una prevalencia del 12,5% y un tiempo de generación de 62 horas (condiciones simulación 3 de la contaminación inicial). Una vez obtenido como resultado el nº de casos bajo esas condiciones, se fija una disminución del 50% de los mismos, para así estimar la prevalencia máxima. De acuerdo a este análisis se estima una prevalencia máxima de 4,325% para obtener dicha reducción.

3.2. Escenario 2.- Efecto de las condiciones en el hogar.

En este escenario se ha evaluado el efecto de la manipulación y el tratamiento de producto contaminado en el hogar, considerando la temperatura de almacenamiento, la contaminación cruzada por manipulación del alimento y el tratamiento culinario del mismo.

SIMULACIONES

Tª refrigeración en el hogar

En el estudio realizado por James *et al.* (2008), se recoge la temperatura de 3700 frigoríficos de diferentes países de la UE y de EEUU, indicando que el 44,5% de estos electrodomésticos tienen una temperatura superior a 5°C. En base a lo anterior, se pretende estimar el número de casos de listeriosis por el consumo jamón cocido, el cual ha sido almacenado a una temperatura que puede oscilar entre 4°C y 10°C.

Para cada una de las temperaturas consideradas se obtiene un tiempo de generación, mediante la herramienta ComBase. Se mantiene constante la prevalencia (12,5%) y la concentración inicial (100 ufc/g).

Tabla 11.- Tª de almacenamiento consideradas en los refrigeradores domésticos.

Simulación	Temperatura (°C)	Tiempo generación (h)
1	4	62,29
2	6	41,18
3	8	27,96
4	10	19,49

Tabla 12.- Estimación del número de enfermos a causa de *Listeria monocytogenes* en la población española, en función de la Tª de almacenamiento.

	Riesgo relativo a nivel poblacional (por 100000 personas)			
	Simulación 1	Simulación 2	Simulación 3	Simulación 4
Nº porciones contaminadas ^a	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)
Minorista (nº ufc)	1,86E+09 (1,01)	1,86E+09 (1,01)	1,87E+09 (1,01)	1,85E+09 (1,00)
Almacenamiento (nº ufc)	1,88E+09 (0,874)	1,91E+09 (0,887)	1,99E+09 (0,926)	2,15E+09 (1,00)
Preparación (nº ufc)	1,88E+09 (0,874)	1,91E+09 (0,887)	1,99E+09 (0,926)	2,15E+09 (1,00)
Número de infecciones	0,537 (0,873)	0,545 (0,886)	0,569 (0,925)	0,615 (1,00)
Número de casos	0,483 (0,873)	0,491 (0,888)	0,512 (0,926)	0,553 (1,00)
DALY población	14,179 (0,874)	14,397 (0,887)	15,023 (0,926)	16,230 (1,00)
Costes población (€)	4,11E+05 (0,874)	4,17E+05 (0,887)	4,35E+05 (0,926)	4,70E+05 (1,00)

^a Número de porciones contaminadas a nivel de minorista, almacenamiento y preparación.

Entre paréntesis se encuentran los resultados expresados como riesgo relativo en función del caso más desfavorable que es el de la temperatura de refrigeración de 10°C.

La tabla 12 muestra los resultados de las diferentes simulaciones. Como se puede observar, al variar la Tª varía también el tiempo de generación, y estas dos variables tienen ligero efecto en el nº de casos de listeriosis. Probablemente debido al incremento de la concentración bacteriana que se

puede producir conforme se incrementa la temperatura para una misma unidad de tiempo.

Contaminación cruzada

La contaminación constituye una de las causas más frecuentes de toxiinfecciones alimentarias en las cocinas del hogar. Se puede producir tanto por contacto directo entre dos alimentos como de forma indirecta a través de las manos del manipulador, utensilios de cocina, superficies, etc. Para evitar dicha contaminación se deben extremar las medidas higiénicas en el hogar tanto del manipulador como de los utensilios utilizados, así como evitar el contacto entre alimentos cocinados y crudos.

Para cada una de los tipos de contaminación cruzada posibles se realiza una simulación, estimando que el 100% de las porciones de cualquier alimento contaminado puede producir contaminación cruzada hacia el jamón cocido a través de la manipulación, utensilios de cocina, etc. (Tabla 13).

Partiendo de que el alimento se encuentra almacenado a una T^a de refrigeración adecuada (4°C); el número de casos de listeriosis a causa de la contaminación cruzada se estima teniendo en cuenta el porcentaje de porciones del alimento contaminado que producen contaminación cruzada con otro producto, con las manos del manipulador y con las superficies de contacto y dada esa contaminación cruzada, cual es la fracción de ufc (log₁₀) en la porción del alimento que será consumida.

Los resultados de la simulación se pueden apreciar en la tabla 14.

Tabla 13.- Porcentaje de ufc transferidas por contaminación cruzada al producto, manos del manipulador y superficie de contacto a partir de un producto contaminado (Hoelzer *et al.*, 2012)

Simulación	Contaminación cruzada	Transferencia (%)
1	Producto*-Producto	25%
2	Producto*-Manos-Producto	60%
3	Producto*-Superficie contacto-Producto	65%

(*) Se parte de un producto con una contaminación inicial de 100 log ufc/g.

Tabla 14.- Estimación del n^o de enfermos a causa de *Listeria monocytogenes*, en función de la contaminación cruzada.

	Riesgo relativo a nivel poblacional (por 100000 personas)		
	Simulación 1	Simulación 2	Simulación 3
N ^o porciones contaminadas ^a	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)
Minorista (n ^o ufc)	1,86E+09 (0,995)	1,86E+09 (0,998)	1,87E+09 (1,00)
Almacenamiento (n ^o ufc)	1,87E+09 (0,995)	1,88E+09 (0,998)	1,88E+09 (1,00)
Preparación (n ^o ufc)	1,41E+09 (0,882)	1,55E+09 (0,973)	1,60E+09 (1,00)
Número de infecciones	0,402 (0,882)	0,444 (0,973)	0,456 (1,00)
Número de casos	0,362 (0,882)	0,399 (0,973)	0,411 (1,00)
DALY población	10,6 (0,882)	11,7 (0,973)	12,0 (1,00)
Costes población (€)	3,08E+05 (0,882)	3,40E+05 (0,973)	3,49E+05 (1,00)

^a Número de porciones contaminadas a nivel de minorista, almacenamiento y preparación.

Entre paréntesis se encuentran los resultados expresados como riesgo relativo en función del caso más desfavorable que en este caso corresponde al porcentaje de transferencia del 65%.

Como se puede apreciar, el modo por el que se produce la contaminación cruzada no afecta significativamente al número de casos, por lo que resulta fundamental extremar las medidas de higiene tanto del manipulador como de los utensilios, así como evitar el contacto directo con otros productos crudos.

Tratamiento culinario (Efecto de la temperatura y tiempo)

Se pretende estimar el número de casos de listeriosis provocados por *L. monocytogenes* en función del tratamiento culinario llevado a cabo en el hogar. Para ello se tiene en cuenta el binomio tiempo-temperatura, así como el porcentaje de producto que se encuentra cocinado, semi-cocinado o sin tratamiento culinario.

Se llevan a cabo 3 simulaciones (Tabla 15), en las que las características de inactivación del patógeno son las siguientes: DRT (min)= 22,53; z (°C)= 6,22 y la T^a de referencia 55°C (Tabla 2).

Tabla 15.- Tratamiento culinario (T^a/t) realizado al producto.

Simulación	Producto	Tratamiento	% Porción		T ^a (°C)	t (min)
			Cocinado	Semicocinado		
1	Pizza ^a	Horno	100		180	15
2	Sándwich ^b	Sandwichera		100	80	5
3	Pasta ^c	Olla		100	50	3

(^a) La pizza lleva jamón cocido; (^b) El sándwich lleva jamón cocido; (^c) A la pasta se le añade el jamón cocido una vez está cocida. Se considera el tiempo efectivo a dicha T^a.

Tabla 16.- Estimación del n^o de enfermos a causa de *Listeria monocytogenes*, en función del tratamiento culinario realizado.

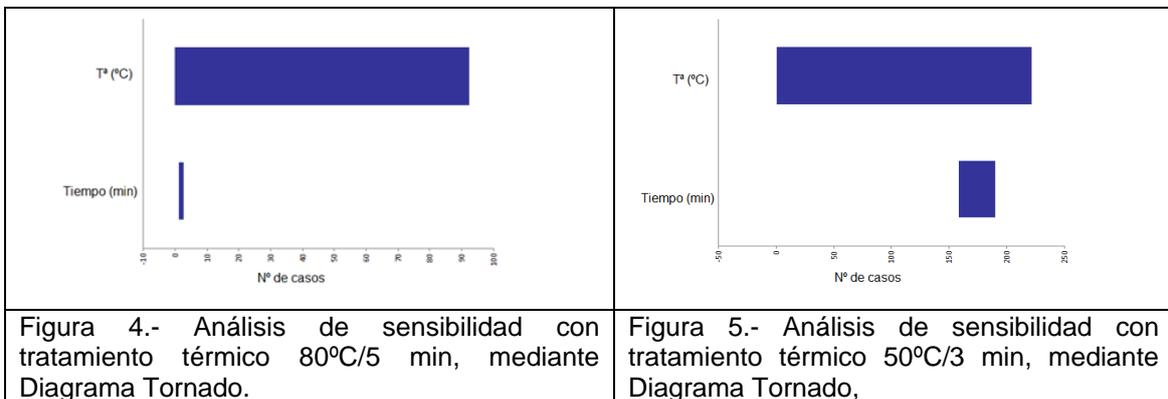
	Riesgo relativo a nivel poblacional (por 100000 personas)		
	Simulación 1	Simulación 2	Simulación 3
Minorista (n^o porciones contaminadas)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)
Almacenamiento (n^o porciones contaminadas)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)	1,67E+05 (1,00)
Preparación (n^o porciones contaminadas)	0,00 (0,00)	7,70E+03 (0,05)	1,54E+05 (1,00)
Minorista (n^o ufc)	1,86E+09 (0,997)	1,86E+09 (0,997)	1,86E+09 (1,00)
Almacenamiento (n^o ufc)	1,87E+09 (0,997)	1,87E+09 (0,997)	1,88E+09 (1,00)
Preparación (n^o ufc)	0,00 (0,00)	1,78E+07 (0,013)	1,40E+09 (1,00)
Número de infecciones	0,00 (0,00)	0,0051 (0,013)	4,00E-01 (1,00)
Número de casos	0,00 (0,00)	0,0046 (0,013)	0,3602 (1,00)
DALY población	0,00 (0,00)	0,135 (0,013)	10,6 (1,00)
Costes población (€)	0,00 (0,00)	3890 (0,013)	3,06E+05 (1,00)

Entre paréntesis se encuentran los resultados expresados como riesgo relativo en función del caso más desfavorable que en este caso es el cocinado de la pasta.

La tabla 16 muestra el resultado de las simulaciones. Como se puede apreciar, a medida que el tratamiento térmico es más leve, el número de casos de listeriosis aumenta. Por consiguiente, es necesario actuar en función de las posibilidades del electrodoméstico utilizado y del posible efecto en el alimento, aumentando el tratamiento térmico en cuanto a temperatura y tiempo. Aunque a continuación se realizará el análisis de sensibilidad, para conocer cuál de los dos parámetros ejerce mayor efecto en el número de casos

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

El objetivo es comprobar que variable del tratamiento térmico realizado al producto afecta más al número de casos de listeriosis. Se realiza el análisis partiendo de dos tratamientos culinarios, el primero para el tratamiento en sandwichera (80°C/5 min) y el segundo para el tratamiento en olla (50°C/3 min). Se llevan a cabo 14 simulaciones con 1000 iteraciones por simulación, con un total de 14000 iteraciones.



Dichas figuras muestran que la temperatura es el parámetro que más afecta al número de casos de listeriosis. Por tanto, una estrategia para reducir la incidencia de dicha enfermedad podría ser aumentar la temperatura en tratamiento culinario, siempre que sea posible.

ANÁLISIS GOAL SEEK

Se pretende conseguir una reducción del 50% de los casos de listeriosis, para ello se trabaja con la simulación 3 (50°C/3 minutos), ya que se considera el escenario más problemático.

Una vez realizado en análisis se obtiene que para conseguir dicha reducción de los casos de listeriosis sería necesario aumentar la temperatura a 58°C, manteniendo un tiempo de tratamiento de 3 minutos. Considerándose que la inactivación de *L. monocytogenes* se da a partir de 55°C.

4. CONCLUSIONES

La herramienta SQMRAv2 ha resultado de gran utilidad para la estimación del riesgo asociado al consumo de un determinado producto contaminado. Es bastante flexible y se acopla perfectamente al @Risk de Palisade para llevar a cabo las simulaciones Monte Carlo.

De todas las variables estudiadas en el primer escenario, la prevalencia, en mayor medida, y el nivel de contaminación inicial del producto son las que más afectan al riesgo de enfermar por *L. monocytogenes*.

La variación de la T^a de almacenamiento entre 4-10°C, considerada en el segundo escenario, afecta ligeramente al número de casos de listeriosis, seguramente debido a que influye en el tiempo de generación de la bacteria.

La contaminación cruzada supone un problema al nivel del hogar al ser una de las principales causas de toxiinfección en el mismo, y aunque el modo de transferencia del microorganismo no afecte significativamente al riesgo de padecer listeriosis, es muy importante controlar las condiciones de manipulación en el hogar, con especial atención a las superficies en contacto con el producto.

El tratamiento culinario al que podría someterse al jamón cocido tiene una influencia muy significativa en el riesgo de enfermar a causa de dicha bacteria; y como se ha demostrado, el factor que más afecta es la temperatura de cocinado.

El número de casos de listeriosis estimados en los distintos escenarios son del mismo orden que los descritos epidemiológicamente, por lo que consideramos que los datos de entrada y la herramienta están funcionando correctamente.

5. REFERENCIAS

AFFSA. 2008. Technical Guidance Document. On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods. Maisons-Alfort, France.

B. Ayebah, Yen-con Hung, Chyer Kim and J. F. Frank. 2006. Efficacy of Electrolyzed Water in the Inactivation of Planktonic and Biofilm *Listeria monocytogenes* in the Presence of Organic Matter. Journal of Food Protection, 69(9):2143–2150.

CCFRA. 2006. Pasteurization: a food industry practical guide (2^a Edition). Guideline,51.

Charalambia-Eirini A., Belessi, Antonia S. Gounadaki, Antonios N. Psomas, Panagiotis N. Skandamis. 2011. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. International Journal of Food Microbiology,145:S46–S52.

Daniel Gallagher, Eric D. Ebel, Owen Gallagher, David LaBarre, Michael S. William, Neal J. Golden, Régis Pouillot, Kerry L. Dearfield, Janell Kause. 2013. Characterizing uncertainty when evaluating risk management metrics: Risk assessment modeling of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat deli meats. International Journal of Food Microbiology, 162:266-275.

Directiva 2006/52/CE del parlamento europeo y del consejo de 5 de julio de 2006 por la que se modifica la Directiva 95/2/CE relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y

edulcorantes y la Directiva 94/35/CE relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios.

Donlan Rodney and William Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganism. *Clinical Microbiology Review*, 15 (2): 167-193.

EFSA. 2011, 2012, 2013, 2014, 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. The EFSA Journal.

Eileen B. Somers, Jean L. Schoeni, Amy C.L. Wong. 1994. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 22: 269-276.

E. Scallan, R. M. Hoekstra, B. E. Mahon, T. F. Jones and P. M. Griffin. 2015. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiology and Infection*, 143:2795–2804.

Eric G. Evers, Jurgen E. Chardon. 2010. A swift Quantitative Microbiological Risk Assessment (sQMRA) tool. *Food Control*, 21:319–330.

FAO/OMS. 2014. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Resumen interpretativo. Serie de Evaluación de Riesgos microbiológicos: 4. (Dennis Kunkel Microscopy Inc, Ed.) (1 edición, p. 54).

Faria, D.B, Caballero Gómez, Franco, B. D.G.M. Cross-contamination of ready-to-eat roast beef by *Listeria monocytogenes* treated with sublethal concentration of quaternary ammonium, during mechanical slicing. University of São Paulo.

F. J. Perez, J. Salmerón, M. Albisu, C. Casas. 1999. Formación de películas biológicas en la industria alimentaria. *Food science and technology*, 5(1):25-30.

Hoelzer K., Pouillot R., Gallagher D. 2012. Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation. *International Journal of Food Microbiology*, 157:267–277.

Hoelzer, K., Oliver, H.F., Kohl, L.R, Hollingsworth, J., Wells, M.T., Wiedmann, M. 2012. Structured Expert Elicitation About *Listeria monocytogenes* Cross-Contamination in the Environment of Retail Deli Operations in the United States. *Risk Analysis*, 32(7):1139–1156.

Holah J.T., Bloomfield S.F., Walker A.J. y Spenceley H. 1994. Control of biofilms in the food industry.

Instituto Nacional de Estadística (INE). Cifras de población y censos demográficos (2014).

J. Carballo, A. B Araujo. 2012. Evaluation of the efficacy of commercial sanitizers against adhered and planktonic cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* *Ciencia y Tecnología de Alimentos, Campinas*, 32(3):606-612.

J. B. Robbins, C. W. Fisher, A. G. Moltz, S. E. Martin. 2005. Elimination of *Listeria monocytogenes* Biofilms by Ozone, Chlorine, and Hydrogen Peroxide. *Journal of Food Protection*, 68(3):494–498.

James, S.J., Evans, J., James, C. 2008. A review of the performance of domestic refrigerators. *Journal of Food Engineering*, 87:2–10.

Luigi Iannetti, Vicdalia Aniela Acciari, Salvatore Antoci et al. 2016. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese. *Food Control*, 68:55-61.

Lunden, J. M., M. K. Miettinen, T. J. Autio, and H. J. Korkeala. 2000. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63:1204–1207.

M. Villa. 2014. *Listeria monocytogenes* en comidas preparadas. Eurocarne, 230.

M. Campdepadrós, A. Miguel Stchigel, M. Romeu, J. Quilez, R. Solà. 2012. Effectiveness of two sanitation procedures for decreasing the microbial contamination levels (including *Listeria*

monocytogenes) on food contact and non-food contact surfaces in a dessert-processing factory. *Food Control*, 23:26-31.

M. Simoes, L. C. Simoes, M. J. Vieira. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43:573–583.

Min Seok Chaea, Heidi Schraftb, Lisbeth Truelstrup Hansenc, Robert Mackereth. 2006. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology*, 23:250–259.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). 2004. Base de Datos de Consumo en Hogares. Jamón cocido.

Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional.

Renate Schöbitz, Luigi Ciampi, Yanina Nahuelquin. 2009. *Listeria monocytogenes*, un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, 37(1):1-8.

R.M. Carltona, W.H. Noordmanb, B. Biswasc, E.D. de Meestera, M.J. Loessner. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3):301-312.

Robert L. Buchanan, William G. Damert. 1997. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence listeriosis. *Journal of Food Protection*, 60(8).

Reglamento (CE) no 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Sistema de Información Microbiológica (SIM). Informe anual del sistema de información microbiológica. 2010-2014.

Sokunrotanak Srey, Iqbal Kabir Jahid, Sang-Do Ha. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31:572-585.

Tom Ross, Sven Rasmussen, John Sumner. 2009. Using a quantitative risk assessment to mitigate risk of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. *Food Control*, 20: 1058–1062.

Torres K.J, Sierra S.C, Poutou R.A. 2004. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de los alimentos. *Revista UDCA Actualidad y divulgación científica*, 7.

Torres K.J, Sierra S.C, Poutou R.A. 2005. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ- Córdoba*, 10:511-543.

USDA. 2003. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition; U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service; and Centers for Disease Control and Prevention. 2003. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods.

Vaid,R., Linton, R.H., & Morgan, M.T. 2010. Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. *Food Microbiology*, 27(8):979–984.

V. Garrido, A.I. Vitas, I. García-Jalón. 2009. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control*, 20:986–991.

Xianming Shi, Xinna Zhu. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries (Review). *Trends in Food Science & Technology*, 20:407-413.