



Universidad
de La Laguna

Departamento de Microbiología



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA

Applications of predictive microbiology on food industry

Aplicaciones de la Microbiología Predictiva en la Industria Alimentaria

Katherine Martínez García

Grado en Biología
Septiembre 2016

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 20__/20__	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

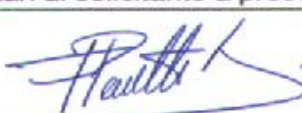

Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
79060431R	Katherine Martínez García
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
665544285	martinezgarcia Katherine@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Aplicaciones de la Microbiología Predictiva en la Industria Alimentaria

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D. Fernando Perestelo Rodríguez	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biol. Celular y Genética	
Y Dña. Ana María Rodríguez Pérez	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biol. Celular y Genética	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.: 	Fdo.: 

La Laguna, a 2 de Septiembre de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Índice

I. Resumen.....	1
II. Summary	1
III. Introducción	2
1. Modelos Predictivos.....	2
1.1. Tipos de Modelos Predictivos.....	3
1.1.1. Modelos Primarios.	3
1.1.2. Modelos Secundarios.	4
1.1.3. Modelos Terciarios.....	5
1.2. Aplicaciones de la microbiología predictiva.....	6
1.2.1. Estudio de la vida útil.....	7
1.2.2. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)	9
1.2.3. Evaluación y gestión de riesgos microbiológicos	10
2. Importancia de la Microbiología predictiva en la industria cárnica.....	11
2.1 Carne y productos cárnicos	12
2.3 Legislación y normativas de la industria cárnica en la Unión Europea.....	12
2.4 Selección de los organismos en productos cárnicos.....	14
3. Ejemplo de aplicaciones de la microbiología predictiva en la industria cárnica.....	15
3.1. <i>Listeria monocytogenes</i> y productos listos para el consumo (LPC).....	15
3.3 Medidas higiénicas y caracterización de riesgo e integración de temperatura en productos cárnicos.....	19
4. Conclusiones	22
5. Referencias bibliográficas.....	23

I. Resumen

La microbiología predictiva reúne diversas ramas del conocimiento como son estadística, química, ingeniería informática y ecología microbiana para crear y desarrollar modelos que nos permiten predecir el comportamiento de ciertos microorganismos en alimentos. Estos modelos matemáticos describen el crecimiento, desarrollo, supervivencia, inactivación de los microorganismos o los procesos bioquímicos que ocurren en un alimento a causa de la exposición e interacción con el microorganismo. Por ello, estos modelos predictivos son una herramienta importante en la industria alimentaria, especialmente en la cárnica debido a su interés comercial, el elevado volumen de demanda y el riesgo que supone para los consumidores la ingesta de este tipo de productos con bajas condiciones de calidad y seguridad. Asimismo, permite la estimación de los riesgos biológicos dentro del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), la evaluación cuantitativa del riesgo durante todos los procesos de la cadena alimentaria, así como realizar una estimación de la vida útil de los alimentos, facilitando la optimización de los procesos de elaboración. Este trabajo tiene por objeto poner de manifiesto la importancia de la microbiología predictiva en la industria alimentaria, haciendo especial hincapié en los aspectos aplicados referidos a la industria cárnica.

Palabras clave: APPCC, Industria alimentaria, Industria cárnica, Microbiología predictiva, Modelos predictivos, Vida útil.

II. Summary

Predictive microbiology combines a different branch of knowledge (statistic, chemistry, informatics engineering and microbial ecology) to create and develop models that allow us to predict food microbial behavior. These mathematics models describe the growth, development, survival, inactivation or biochemistry process by food microbial, helping to make an important tool on food industry, especially on meat industry, due to its commercial interests, high volume of demand and the risk to involved consuming these products with microbiological contamination. Predictive microbiology allows estimate the biological risk on Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP), at the same time creates a quantitative evaluation risk assessment for all processes on food chain. Further, It is make possible to estimate the shelf life of food and promotes a better optimize on elaboration process. In conclusion, one of the most studied and developed area on food microbiology is the predictive microbiology, which has gained a significant attention on the scientific community, producing a greater impact on the field of food industry. In this present work, the objective is relevance some applications on predictive microbiology in food industry, especially on the meat industry.

Key words: Food Industry, Food Safety, HACCP, Meat Industry, Predictive microbiology, Predictive models, Shelf Life.

III. Introducción

El notable incremento en la demanda de productos alimentarios mínimamente procesados y cuyo consumo sea rápido pero manteniendo condiciones de calidad y seguridad, genera una serie de desafíos a los que la industria alimentaria ha de adaptarse. Así bien, el desarrollo e innovación de alternativas, como es la microbiología predictiva, ha permitido la evolución de este sector durante las últimas décadas.

La microbiología predictiva investiga los procesos mediante los cuales los microorganismos crecen o son inactivados, y como afectarán la seguridad de los alimentos (Buchanan y Whiting, 1996), definiendo las predicciones de crecimiento o muerte bajo condiciones específicas (Zwietering *et al.*, 1990, Whiting and Buchanan, 1994, Schaffner y Labuza, 1997). Estas predicciones son elaboradas por modelos que simplifican los complejos procesos bioquímicos que rigen el crecimiento de los microorganismos en el alimento, permitiendo estimar la calidad y la seguridad de los mismos en diferentes condiciones (Whiting, 1995), tanto por las propias propiedades intrínsecas del alimento como por los factores ambientales. El modelo predictivo del crecimiento e inactivación bacteriana es un importante tema de investigación entre los microbiólogos, y ello se demuestra en la elevada proliferación de trabajos publicados sobre el tema (Buchanan 1993, McMeekin *et al.* 1993, Skinner y Larkin, 1994, Van Impe *et al.*, 2005, Halder *et al.*, 2010, Esser *et al.*, 2015) especialmente en los relacionados con la industria cárnica (McDonald y Sun 1999, Sumner y Krist 2002, Pin *et al.* 2011, Lan *et al.* 2016) y del pescado (Dalgaard *et al.* 2002, Ross *et al.* 2003, Pin *et al.* 2004, Boonyawantang *et al.* 2012, Langsrud *et al.* 2016).

1. Modelos Predictivos

En la microbiología de los alimentos los modelos predictivos son expresiones matemáticas que simplifican los procesos bioquímicos de la cinética bacteriana y ayudan a elaborar una predicción de las condiciones microbiológicas que presentará un alimento en un proceso determinado durante la cadena alimentaria. Los modelos han de desarrollarse partiendo de una serie de etapas que permiten identificar los factores claves que afectan al crecimiento microbiano. Estas etapas se simplifican en la planificación, el diseño experimental, la toma de datos y los convenientes ajustes en la

curva de crecimiento gracias a descripciones matemáticas. Finalmente, se obtiene un modelo que debe de ser validado para, una vez aceptado, llevar a cabo su aplicación.

Los modelos utilizados se basan en datos empíricos que describen y caracterizan las respuestas microbiológicas frente a factores ambientales (Geeraerd *et al.*, 2004). A este respecto, Ratkowsky *et al.* (2005) describieron los efectos de la temperatura en las tasas de crecimiento de las poblaciones microbianas, basados en la desnaturalización reversible de las proteínas, tanto a baja como a alta temperatura.

Estudios de origen molecular como el de Konstantinos *et al.* (2016), nos muestra hacia dónde se dirige la microbiología predictiva mediante las nuevas generaciones de modelos, con conocimientos proporcionados por la ingeniería genética en relación a la plasticidad fenotípica y consecuentes respuestas de supervivencia, crecimiento e inactivación de los microorganismos. Asimismo, otras investigaciones de carácter fisiológico pueden predecir e identificar puntos de control específicos de ciertos microorganismos o el comienzo de eventos significativos en la microbiología, como es la esporulación. (Oomes *et al.*, 2007).

1.1. Tipos de Modelos Predictivos

Los modelos predictivos pueden ser clasificados según su fundamento matemático (empíricas o mecanicistas, Roels y Kossen, 1978), según modelos probabilísticos y cinéticos (Roberts, 1989) y, según modelos primarios, secundarios y terciarios, siendo ésta última clasificación propuesta por Whiting y Buchanan (1993) la más utilizada en la comunidad científica, ya que incluye, complementa y unifica las anteriores (Geeraerd *et al.* 2004). Por consiguiente, ésta es la que describiremos, brevemente, a continuación:

1.1.1. Modelos Primarios. Son los modelos predictivos más sencillos. Se basan en una descripción del número de unidades formadoras de colonias en función del tiempo, y valoradas en distintas condiciones experimentales. Su principal objetivo es averiguar la cinética de crecimiento de los distintos microorganismos con el mínimo de parámetros posibles, evitando así la pérdida de exactitud de los valores con cálculos muy elaborados. Este primer modelo nos proporciona información específica de los microorganismos a estudio, como son el tiempo de generación (t_0), la duración de la fase de latencia o fase lag (λ), la velocidad máxima de

crecimiento (μ_{max}), o el tiempo de formación de toxinas. Dos ejemplos para la elaboración de estos modelos podrían ser de la Ecuación de Gompertz o la Ecuación Baranyi representados en la Tabla1 (Forsythe, 2002; Baranyi y Roberts, 1994).

Nombre	Expresión matemática
Ecuación modificada de Gompertz	$\text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_o) + \left[\frac{A \times e^{\left(-e^{\left[\frac{\mu_{max} \times e^1}{A} \times (lag-time)+1 \right]} \right)}}{\text{Ln}(10)} \right]$
Ecuación de Baranyi y Roberts	$\text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_o) + \frac{1}{\mu_{max}} \times \left[t + \frac{1}{\mu_{max}} \times \text{Ln} \left(\frac{\exp(\mu_{max} \times time) + q_o}{1 + q_o} \right) \right] - \frac{1}{\text{Log}(10)} \times \text{Ln} \left(1 + \frac{\exp(\mu_{max} \times \left[time + \frac{1}{\mu_{max}} \times \text{Ln} \left(\frac{\exp(-\mu_{max} \times time) + q_o}{1 + q_o} \right) \right]) - 1}{\exp(\text{Log}(N_{max}) - \text{Log}(N_o))} \right)$

Tabla1: Ejemplos de modelos primarios que muestran la respuesta de los microorganismos N_t : densidad de población (ufc·ml⁻¹) en tiempo t (horas), N_o : población inicial, A: valor asintótico cuando el tiempo decrece indefinidamente, μ_{max} : velocidad máxima de crecimiento, q_o : Concentración inicial del sustrato limitante.

1.1.2. Modelos Secundarios. Una vez obtenidos los parámetros cinéticos de crecimiento del microorganismo proporcionados por los modelos primarios, se elaboran expresiones matemáticas que describen la respuesta de éstos frente a cambios en los parámetros ambientales, que afectan tanto a factores intrínsecos del producto (pH, [sales], [NO₂⁻], etc.), como a factores extrínsecos (temperatura de almacenamiento, humedad relativa, interacción con otros microorganismos, etc.). Ejemplos de estos modelos son los basados en ecuaciones polinómicas, redes neuronales artificiales, modelos de raíz cuadrada, superficie-respuesta o la ecuación de Arrhenius (Lebert *et al.* 2000, Zurera *et al.* 2006, Geeraerd *et al.* 1998, Buchanan y Klawitter, 1991, Davey, 1993).

Nombre	Expresión matemática
Ecuación de Arrhenius	$\text{Ln}k = C_o + \sum_{i=1}^j (C_{2i-1} V_i + C_{2i} V_i^2)$
Modelo de raíz cuadrada	$\sqrt{k} = b(T - T_{min})$

Tabla 2: Ejemplo de modelo secundario.

k: tasa de crecimiento (tiempo^{-1}), V= factores ambientales (temperatura, [sal], pH, etc.), C_0-C_{2i} son los coeficientes que son determinados con j factores ambientales en combinación, b: la pendiente de la recta de regresión entre \sqrt{k} y T, T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), T_{\min} : temperatura hipotética de crecimiento donde la recta de regresión corta eje T cuando $\sqrt{k} = 0$.

1.1.3. Modelos Terciarios. Este tipo de modelos incorporan los dos tipos anteriores, simplificándolos de forma específica mediante software, el cual permite determinar la extensión y tasa de crecimiento del microorganismo, así como comparar los efectos producidos en diferentes condiciones. Con este tipo de tecnología se puede estimar la vida útil del producto alimentario o minimizar el riesgo de pérdida de calidad e inocuidad del alimento. En este nivel se incluyen algoritmos para calcular los cambios producidos en el alimento, la comparación del comportamiento del microorganismo bajo distintas condiciones, o gráficos del crecimiento simultáneo de varios microorganismos. Muchos de estos software se encuentran disponibles de forma gratuita y pueden ser fácilmente manejable por los usuarios. (Tabla2).

Software de predicción	Enlace	Institución	Referencias
ComBase	http://www.combase.cc	Institute of Food Reseach (IFR, UK)	Baranyi y Tamplin. 2004
Pathogen Modeling Program	http://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx	United States Department of Agriculture, Agriclture Research Service (EEUU)	Buchanan <i>et al.</i> , 1993, Buchanan y Klawitter, 1991
Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	http://fssp.food.dtu.dk	Danish Institute for Fisheries Researchs y la Universidad Técnica de Dinamarca	Dalgaard <i>et al.</i> 2002
Listeria Meat Model	www.cpmf2.be	Jan van Impe (KU Leuven, Bélgica)	
MicroHibro	www.microhibro.com	Universidad de Córdoba	
Prediction of Microbial Safety in Meat Products	http://dmripredict.dk/	Danish Meat Research Institute (Dinamarca)	
Refrigeration Index Calculator	http://ricalculator.mla.com.au/	Universidad de Tasmania	Ross <i>et al.</i> 2003
Sym`Previus	www.symprevius.org	ADRIA Développement (Francia)	

Tabla2: Ejemplos de algunos de los modelos terciarios aplicados en el industria alimentaria.

1.2. Aplicaciones de la microbiología predictiva

La microbiología predictiva, en el ámbito educativo, ha permitido que los modelos sean utilizados como herramientas muy útiles, tanto para personal especializado como para los que no, ya sea mediante la generación de gráficas, que sirven como ejemplo ilustrativo, la estimación de tiempos de crecimiento o de inactivación microbiana, permiten una explicación más clara de la cinética y ecología bacteriana (McDonald, y Sun, 1999). Asimismo, genera una gran base de datos y software, que mejora sustancialmente los sistemas de decisión automáticos, con ayuda de equipos de monitorización y computación. Además, permite la realización de diseños experimentales, cuya aplicación puede desarrollarse en función del objetivo final y para la que resulta útil la formulación de una serie de preguntas (Shimoni y Labuza, 2000), como por ejemplo:

- Si alteramos los valores de pH en un producto, ¿Cómo afectaría al crecimiento de *Listeria monocytogenes*?
- ¿Cómo variará la vida útil este alimento si se incrementa su a_w ?
- ¿Qué concentración de conservante debo añadir si deseo que mi producto no presente crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante 3 meses?
- ¿Cuánto tiempo debo tratar mi producto con un tratamiento térmico para eliminar o disminuir el crecimiento de una bacteria concreta?
- ¿El proceso establecido puede eliminar la bacteria?

Membré y Lambert (2008) describen una serie de aplicaciones en un contexto más industrial, que podemos resumir a continuación:

- **Desarrollo e innovación de nuevos productos.** Capaz de crear el desarrollo alternativo de productos alimentarios con la evaluación del impacto del crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro, lo que proporciona unas condiciones de mayor seguridad en las cadenas de producción alimentarias. A su vez, provoca el aumento de la vida útil del producto, valorando los efectos del procesado en la calidad y seguridad alimentaria.

- **Ayuda operativa.** Ofrece una ayuda en la toma de decisiones referidas a la seguridad alimentaria, cuando se llevan a cabo operaciones en la cadena de producción generando un análisis de riesgo preliminar y evaluando la exposición a un patógeno específico. Por otro lado, identifica y establece los puntos críticos de control (PCC) en sistemas APPCC, evaluando el impacto en caso de pérdida de calidad o seguridad microbiológica de los productos alimentarios, estimando la dinámica de las poblaciones a lo largo de la cadena alimentaria.
- **Ayuda en incidentes.** Estima el impacto sobre la calidad del producto o la seguridad de los consumidores en caso que se encuentren problemas con los productos del mercado, evaluando las variables y proporcionando medidas correctoras.

Como se comentaba anteriormente, los modelos predictivos proporciona conocimientos a la hora de realizar un estudio de la vida útil de un producto determinado, prediciendo el crecimiento de microorganismos patógenos o degradadores, investigando los efectos que determinan los cambios en la vida útil del mismo. A continuación veremos esta, y otras dos aplicaciones más ampliamente.

1.2.1. Estudio de la vida útil

La vida útil de un alimento a lo largo de la historia se ha intentado definir de muchas maneras. Un ejemplo es el proporcionado por Fu y Labuza (1993) “La vida útil de un alimento es el período de tiempo en el que el producto se vuelve inaceptable desde la perspectiva sensorial, nutricional o de seguridad”. Otra definición de vida útil proporcionada por Institute of Food Science and Technology la describe como “el tiempo en el cual el producto se mantenga seguro, presente sus propiedades organolépticas, físicas y microbiológicas, y finalmente cumpla con los requisitos nutricionales, una vez se almacena en las condiciones recomendadas” (IFSF 1993). Sin embargo la definición actual propuesta por El Parlamento Europeo señala la vida útil como “el período anterior a la fecha de duración mínima o a la fecha de caducidad” (Reglamento C.E. 2073/2005), y donde la fecha de duración mínima de un producto alimenticio es “la fecha hasta la cual dicho producto alimenticio mantiene sus propiedades específicas siempre que el producto se guarde en condiciones de conservación adecuadas” (Directiva 2000/13/CE, Artículo 9). “En el caso de productos alimenticios microbiológicamente muy perecederos y que por ello puedan suponer un

peligro inmediato para la salud humana, después de un corto período de tiempo, la fecha de duración mínima se cambiará por la fecha de caducidad” (Artículo 10).

Existen varios factores que afectan a la estimación de la vida útil de un producto sin la intervención del consumidor, como son las propiedades intrínsecas del propio alimento, los elementos extrínsecos, que engloban aquellos proporcionados por el ambiente durante su distribución y su almacenamiento y por último, el tipo de almacenamiento (Gordon L, 2009).

Los factores intrínsecos, como se ha nombrado anteriormente, son aquellos que poseen los propios productos, entre los que se encuentran el pH del alimento, los nutrientes, la actividad de agua (a_w), el potencial redox, el valor total de la acidez, el oxígeno disponible, la propia flora natural y los microorganismos que han superado los tratamientos de conservación. Por otro lado, los factores extrínsecos son aquellos que no presentan relación con el producto, pero que puede afectar a su calidad. Entre ellos se encuentra el tiempo y la temperatura durante la elaboración del producto, la humedad relativa, el control de temperatura durante su distribución y almacenamiento (Devlieghere *et al.* 1999, 2000, 2001). La interacción de estos factores influye en la calidad final del producto ya que pueden generar o inhibir determinadas reacciones bioquímicas que alteran las características organolépticas del alimento (Labuza *et al.* 1992). Los alimentos pueden ser clasificados como perecederos, cuya vida útil es muy corta, semiperecederos, con una vida útil corta o media y los poco perecederos los cuales presentan una mayor vida útil (Tabla 3).

Alimento	Duración	Almacenamiento
Perecederos	7 Días	Congelación o refrigeración entre -12°C a -18°C o 0°C y 7°C
Semiperecederos	30 – 90 Días	Sometidos a pasteurización, fermentaciones, Etc.
No perecederos	Varios meses, o años	Esterilizados, deshidratados, etc.

Tabla 3. Comparación del tiempo de los tipos de alimentos en relación con el tipo de almacenamiento que se lleve a cabo.

La evaluación de la vida útil de un producto se puede llevar a cabo con el uso de herramientas modelado de crecimiento microbiano. Diversas publicaciones, comprueban la eficacia de los modelos predictivos para estudiar de la vida útil. En relación a esto, un estudio elaborado por Rodríguez (2003) en el que se desarrollan y validan modelos matemáticos para la predicción de la vida comercial de productos

cárnicos envasados al vacío, y obteniendo los resultados más satisfactorios la aplicación de modelos de Redes Neuronales para la predicción de su vida comercial.

1.2.2. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)

Existen unos requerimientos sanitarios de carácter obligatorio tanto para grandes como pequeñas empresas, regulados por las sociedades de salud alimentaria, como la Organización Mundial de la Salud o la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, cuyo objetivo es conseguir la máxima seguridad en los alimentos teniendo en cuenta la actividad microbiológica (FAO/WHO, 2006). Los sistemas de APPCC son herramientas de seguridad en todo tipo de industrias alimentarias, permitiendo identificar peligros, establecer sistemas de control preventivos y, de este modo, disminuir los riesgos de fabricación de productos en malas condiciones y su posterior comercialización (Mortimore y Wallace, 2013). Actualmente, se continúa evaluando los sistemas APPCC con la integración de nuevas normativas ISO (Organización Internacional de Normalización). ISO22000:2005, implanta una serie de requisitos en el sistemas de gestión de seguridad alimentaria, estructurando, controlando y actualizando para cualquier estructura en la cadena alimentaria, generando sistemas más eficaces (Soman y Raman, 2016).

Para elaborar un sistema de APPCC es necesario conocer e identificar unos puntos esenciales que se aplican en toda la cadena de producción, desde su cosecha y crecimiento hasta el consumo del alimento. Estos puntos se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Descripción del producto e identificación de su uso.
2. Describir y desarrollar un flujograma de los procesos de producción.
3. Realizar análisis de los peligros e identificar las medidas preventivas en cada etapa del proceso.
4. Determinar los puntos de control críticos (PCC).
5. Establecer límites críticos.
6. Implantar un sistema de control para monitorear los PCC.
7. Elaborar las acciones correctivas cuando el monitoreo indique que un determinado PCC no está bajo control.
8. Establecer procedimientos de verificación para confirmar si el sistema APPCC está funcionando de manera eficaz.

9. Generar documentación para todos los procedimientos y registros apropiados a esos principios y su aplicación.

La microbiología predictiva es crucial en etapas como la realización de análisis de peligro microbiológicos, ya que ayuda a determinar si ciertos alimentos benefician el crecimiento microbiano y la velocidad con que lo hace. Por consiguiente, permite el establecimiento de límites críticos, identifica puntos críticos de control de peligros biológicos, así como conocer la influencia de los factores cinéticos el crecimiento microbiano, con el fin de aumentar la seguridad del producto.

Por último, los modelos predictivos facilitan la elaboración de medidas correctoras, ya que permiten *a priori* conocer el comportamiento de determinados microorganismos, eliminando o reduciendo significativamente su peligro, controlando la magnitud de contaminación y permitiendo la modificación de parámetros del proceso. Además, ayuda a la reducción de costes, priorizando actividades dentro de las cadenas de producción, en definitiva, generando procesos más rápidos y eficientes (Miles y Ross, 1999, McMeekin y Ross, 2002).

A este respecto, en un estudio sobre la aplicación de los modelos predictivos, realizado por Delhalle *et al.*, (2011), teniendo como objetivo valorar el uso de software predictivos para control y seguridad, capaces de simular el crecimiento de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157 en alimentos elaborados con carne picada de cerdo y paté de cerdo. De igual modo, evaluaron las condiciones de crecimiento bajo diferentes factores ambientales, lo que les permite a tiempo real la fabricación de productos o diseños cada vez más seguros.

1.2.3. Evaluación y gestión de riesgos microbiológicos

Todo proceso de fabricación de un alimento debe examinar los potenciales peligros que puedan ocurrir durante las distintas etapas de producción de un alimento. Llevar a cabo una buena gestión de los análisis de peligros es posible gracias a la microbiología predictiva, la cual nos permite prever el número de microorganismos presentes tras un proceso determinado, y establecer procedimientos de control para garantizar la inocuidad del alimento, incluso ayuda a detectar fallos por falta de información, identificar estrategias y establecer guías para la reducción de riesgos en programas de salud pública y seguridad alimentaria. Asimismo, la evaluación

cuantitativa de los riesgos microbiológicos es una herramienta para implementar en los sistemas APPCC y los límites de los PCC.

En este tipo de evaluación se calcula la combinación que existe entre la probabilidad de exposición de un patógeno y la probabilidad de infección o intoxicación de dicho patógeno a un alimento. El resultado de éste determina la gravedad de la enfermedad que puede generar, y a su vez establece el riesgo de enfermedad transmitida por el alimento (Valero 2006).

Para mantener estos riesgos bajo unos niveles control se han elaborado numerosos códigos de práctica y regulación de carácter obligatorio por distintas organizaciones gubernamentales de todo el mundo. Así se implementó el *Codex Alimentarius* lo cual se convirtió en la referencia de requerimientos de seguridad alimentaria internacional. (CAC, 1993; CCFH, 2000). El principal objetivo de CAC (*Codex Alimentarius Committee*) es proteger la salud del consumidor y garantizar las buenas prácticas del comercio de alimentos, elaborando guías y recomendaciones que describen las técnicas y procedimientos de seguridad durante la preparación, manipulado y almacenamiento de los alimentos. En el apartado 3.3 se expondrá un ejemplo asociado a la valoración de riesgos microbiológicos en el sector cárnico.

Teniendo en cuenta los riesgos microbiológicos a los que están sometidos los alimentos, en especial los de origen cárnico, y la importancia que ha tenido los modelos predictivos en el mundo de esta industria, se han elaborado modelos de estimación de riesgo para ayudar a la toma de decisiones críticas en la seguridad alimentaria (McDonald y Sun, 1999, Nauta *et al.* 2007, Perez-Rodriguez *et al.* 2012).

2. Importancia de la Microbiología predictiva en la industria cárnica

En la industria alimentaria, la industria cárnica tiene como objetivo producir, procesar y distribuir la carne de origen animal, siendo ésta la que presenta mayor volumen de producción y venta de productos en todo el mundo. Según el Informe del Consumo Alimentario en España del 2015, proporcionado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España, muestra que el consumo medio aproximado por persona y año de carne es de 50,14 kilos, de los cuales el 74% se corresponde con carne fresca, seguida de un 23,4% sobre el total de carne procesada. Dada su importancia, las precauciones y la seguridad en esta industria deben ser

ampliamente controladas y, en este contexto, la microbiología predictiva resulta una herramienta de gran utilidad al objeto de mantener los niveles de riesgo microbiológico controlados.

Los productos de origen animal presentan una susceptibilidad mayor a la contaminación y al crecimiento de microorganismos que producen degradación y enfermedades en los alimentos (Podpecân *et al.* 2007, Hsi *et al.* 2015, Glass *et al.* 2016). En los productos sin procesar existe un peligro de exposición a patógenos ya que estos alimentos suelen estar en contacto directo con los medios que los albergan, y muchos de estos microorganismos proceden de la propia piel del animal. Sin embargo, en los productos cárnicos procesados también existe un elevado riesgo de contaminación, debido a la elevada manipulación que se lleva a cabo durante los distintos procesos de la cadena alimentaria (Raseta *et al.* 2015).

2.1 Carne y productos cárnicos

La carne es un alimento perecedero que, debido a sus características bioquímicas, pH y a_w , se convierte en un medio que permite la proliferación rápida de microorganismos. Y

Definiciones proporcionadas por el Reglamento C. E. 853/2004

- **Carne fresca:** Aquella que sólo ha sufrido manipulaciones propias del faenado, previas a la distribución, en la que la temperatura de conservación oscila entre 1 y 7 C°.
- **Carne congelada:** Además de las condiciones anteriores, la carne es sometida a condiciones de frío industrial hasta una temperatura de -18C°.
- **Carne picada:** carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos de 1% de sal
- **Preparados cárnicos:** carne fresca incluida la carne que ha sido troceada, a la que se le han añadido productos alimenticios, como condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca.

2.3 Legislación y normativas de la industria cárnica en la Unión Europea.

Para la determinación de la calidad microbiológica de la carne, se utiliza la valoración y cuantificación de microorganismos indicadores, entre los cuales se

encuentran patógenos o no (Wolffs y Radstrom, 2006). En estos microorganismos indicadores de contaminación se incluyen las bacterias aeróbicas mesófilas, coliformes y enterobacterias, estreptococos fecales y *Clostridium* sulfitorreductores. (Junghyun y Myunghee, 2013). Además, se incluyen valoraciones para bacterias específicas, como *E.coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *L. monocytogenes* y algunos Mohos.

Siguiendo las regulaciones de higiene de la Unión Europea (UE) la legislación actual para los productos cárnicos queda representada en:

- C.E. N° 2073/2005: en el cual se establecen criterios microbiológicos que son aplicables a distintos productos alimenticios. Asimismo, en el Artículo 3 exige a los explotadores de empresas alimentarias el cumplimiento de los criterios microbiológicos, la adopción de medidas necesarias para garantizar las medidas de higiene pertinente en cada proceso y la aplicación de los criterios de seguridad aplicables durante toda la vida útil del producto. Además, el Anexo II, especifica que, cuando sea necesario el explotador de la empresa alimentaria realizará estudios complementarios, en los cuales se incluye la utilización de la microbiología predictiva como herramienta. Posteriormente se llevaron a cabo modificaciones específicas para adaptar los criterios expuestos en este reglamento.
- C. E. N° 1441/2007: Con este reglamento se instauran nuevos criterios microbiológicos aplicados, por el reglamento anterior, a los productos alimenticios de distinta índole y especifica a los operadores de las empresas alimentarias responsables, como deben realizar los estudios de higiene y seguridad a lo largo de toda la vida útil del producto.
- C. E. N° 365/2010: deroga el reglamento (CE) N°2073/2005, en lo relativo a los criterios microbiológicos de *Salmonella* aplicables a la carne picada y preparados de carne a base de carnes de aves de corral destinados a ser consumidos cocinados, y a los productos cárnicos hechos a base de carne de aves de corral, destinados a su consumo cocinados.
- C. E. N° 1086/2011: Se modifican el anexo I del reglamento (CE) N°2073/2005 de la Comisión en lo que se refiere a la presencia de *Salmonella* en la carne fresca de aves de corral.
- C.E N° 217/2014: modifica el reglamento (CE) N°2073/2005, en lo relativo a los criterios microbiológicos de *Salmonella* en las canales porcinas.

En la siguiente tabla (Tabla 4) se puede observar una recopilación de las normativas vigentes para los criterios microbiológicos de distintos productos cárnicos y los métodos o normas de seguridad que se emplean (http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/*/*/*normictb.htm).

Alimento	Microorganismos	Plan de toma de muestra		Límites		Método analítico de referencia
		N	c	M	M	
Canales bovinos, ovinos, caprinos y equinos*	Recuento de colonias Aerobias			3,5 log ufc/cm ²	5,0 log ufc/cm ²	ISO 4833
	Enterobacterias			1,5 log ufc/cm ²	2,5 log ufc/cm ²	ISO21528-2
	<i>Salmonella</i>	50	2	Ausencia en la zona examinada por canal		ISO6579
Canales porcinos*	Recuentos de Aerobias			4,0 log ufc/cm ²	5,0 log ufc/cm ²	ISO 4833
	Enterobacterias			2,0 log ufc/cm ²	3,0 log ufc/cm ²	ISO21528-2
	<i>Salmonella</i>	50	3	Ausencia en la zona examinada por el canal		ISO6579
Canales de pollos de engorde y pavos	<i>Salmonella</i>	50	5	Ausencia en 25g de una muestra mezclada de piel del cuello		ISO6579
Carne picada	Recuento de colonias Aerobias	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833
	<i>E. coli</i>	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2
	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 10 g		
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		
Carne mecánicamente separada	<i>Salmonella</i>	5	2	Ausencia en 10 g		ISO 6579
Preparados de Carne	<i>E. coli</i>	5	2	500 ufc/g o cm ²	5000 ufc/g o cm ²	ISO 16649-1 o 2
	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		

M: límite de aceptabilidad por encima del cual los resultados dejan de considerarse satisfactorios

m: límite por debajo del cual todos los resultados se consideran satisfactorios.

n: número de unidades que componen la muestra.

c: número de unidades de la muestra que manifiestan valores situados entre m y M.

*: Los límites (M y m) solo se aplican a las muestras obtenidas por el método destructivo. Los valores obtenidos son medias logarítmicas diarias.

Tabla4: Normas microbiológicas y parámetros de higiene de los procesos.

2.4 Microorganismos más importantes en productos cárnicos.

Aunque son varios los microorganismos que pueden colonizar productos cárnicos y sus derivados, las bacterias son las que adquieren mayor relevancia. Tres de estas bacterias especialmente llamativas por su patogenicidad, son pertenecientes al género *Escherichia*, *Listeria* y *Salmonella*. Hay otros microorganismos como

Campylobacter, que también están presentes durante la producción primaria de este tipo de productos, sin embargo, suelen ser más susceptibles a los procesos y tratamientos de control (Nørrung et al. 2009). En la tabla 5, se pueden observar una lista de varios patógenos, toxinas o sustancias químicas que pueden transmitirse por este tipo de productos.

Bacteria	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>E. coli</i> enterotoxigenica, , <i>St. Parasanguinis</i> , <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Salmonella thyphimurium</i> , <i>Shigella flexneri</i>
Virus	Hepatitis E,
Priones	
Parásitos	<i>Echinococcus spp</i> , <i>Taenia solium</i> , <i>Taenia saginata</i>
Protozoos	<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Sarcocystis spp</i>
Micotoxinas	Zearalenonas

Tabla 5. Patógenos y toxinas emergentes en productos cárnicos

3. Ejemplo de aplicaciones de la microbiología predictiva en la industria cárnica

3.1. *Listeria monocytogenes* y productos listos para el consumo (LPC)

Dentro de las aplicaciones de la microbiología predictiva, como se ha comentado anteriormente, está la generación de nuevos productos, uno de estos y cada vez más demandados son los alimentos listos para el consumo (LPC) o alimentos Ready-to-eat (RTE). Varias investigaciones epidemiológicas relacionan a *Listeria* el aumento de enfermedades transmitidas por alimentos con el consumo de productos LPC (EFSA, 2007). Estudios estadísticas realizadas por la Unión Europea en el periodo 2008-2012, en relación al número de casos de listeriosis en humanos, demostraban un aumento significativo con una tasa de mortalidad de 17,8% (EFSA 2014), a raíz de esto *Listeria monocytogenes* tiene especial relevancia en los productos RTE.

En el marco europeo, *Listeria monocytogenes* queda como única bacteria a analizar en alimentos listos para el consumo según reglamento, estableciendo niveles

máximos de 100 ufc/g durante toda su vida útil (Tabla 6). A pesar de ello, los operadores de la industria, pueden realizar estudios complementarios para la toma de medidas de control y de regulación del riesgo microbiológico. Por el contrario, países como Japón o Estados Unidos, presenta un criterio de seguridad alimentaria para *L. monocytogenes* en alimentos LPC de tolerancia cero.

Alimentos	Microorganismos	Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		M	M		
Alimentos listos para el consumo destinados a lactantes y alimentos listos para el consumo destinados a usos medios especiales ¹	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en	25g	ISO11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a lactantes ni para usos médicos	<i>Listeria monocytogenes</i>	100 ufc/g		ISO11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
		Ausencia en	25 g	ISO11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales. ^{1 y 2}	<i>Listeria monocytogenes</i>	100 ufc/g		ISO11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

¹: En condiciones normales no se exige realizar pruebas regulares con respecto a este criterio para los alimentos listos para el consumo: que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras ese tratamiento.

²: se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con $pH \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$, y los productos con una vida útil inferior a 5 días.

M: límite de aceptabilidad por encima del cual los resultados dejan de considerarse satisfactorios

m: límite por debajo del cual todos los resultados se consideran satisfactorios.

n: número de unidades que componen la muestra.

c: número de unidades de la muestra que manifiestan valores situados entre m y M.

Tabla 6: Normas microbiológicas y parámetros de higiene de los procesos. C. E. N° 1441/2007

Para lograr un control adecuado de *L. monocytogenes* es necesario conocer de antemano los factores que intervienen y afectan al desarrollo, crecimiento y proliferación de esta bacteria. La presencia de *Listeria monocytogenes* es habitual en gran variedad de materias primas por lo que las posibilidades de exposición a esta bacteria son elevadas, por estas razones su ausencia en la cadena de producción es

complicada, pero para evitar la proliferación de ésta hasta niveles significativos, que pueden causar enfermedades, es necesario saber las características de su desarrollo:

- **Temperatura.** *L. monocytogenes* es considerada un organismo mesófilo debido a que su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 30-37° C, sin embargo también es considerada psicrotrofos, ya que es capaz de crecer a temperaturas < 5°C (Tyrovouzis et al. 2014). Por otro lado, no solo presenta resistencia a bajas temperaturas si no que, un mal tratamiento térmico puede ocasionar una resistencia mayor a las altas temperaturas (Doyle *et al.* 2000). Muchos estudios se han llevado a cabo para justificar el comportamiento e inactividad de *L. monocytogenes* en distintos tratamientos térmicos, y elaborar modelos predictivos, sin embargo también se ha observado como dependiendo de las características intrínsecas el alimento se puede observar cierta resistencia a estos procedimientos (Shearer *et al.* 2010).
- **pH.** Presenta un rango de valores de pH entre 4,0 y 9,6, aunque los límites de pH varía dependiendo de la cepa y de la composición del medio.
- **Actividad del agua (a_w).** Como la mayoría de las bacterias, *L. monocytogenes* presenta unos niveles a los que crece rápidamente entre 0,90 y 0,97. Por el contrario en alimentos con una baja a_w tiene la capacidad de sobrevivir pero no de multiplicarse.
- **NaCl.** Esta bacteria se considera halotolerante, con unos valores mínimos < 0,5 y máximos entre 12-16.

Conjuntamente, hay otras cualidades de esta bacteria en la cual queda representada su capacidad de adaptación y patogenicidad. Una de ellas, es la destacada persistencia en las plantas de procesamiento de alimentos, donde una de las superficies más críticas por la transferencia de ésta al alimento, son las cuchillas de las máquinas de corte (Sheen, 2008). *L. monocytogenes* presenta una alta capacidad de supervivencia en distintos ambientes y, a su vez, la competencia para formar biofilms en distintas superficies de la cadena de producción (Samelis y Metaxopoulous 1999, Chasseignaux *et al.* 2002, Martín *et al.* 2014, Gómez *et al.* 2015). La presencia de esta bacteria en las plantas de procesamiento de productos cárnicos constituye una significativa fuente de contaminación.

A este respecto, en un estudio realizado por Koutsoumanis y Angelidis (2007), se evaluaron con modelos predictivos el cumplimiento de la normativa C.E. N°2073/2005 para *Listeria monocytogenes* aplicada a productos cárnicos RTE, y concluyeron que, aunque estos modelos pueden ser una gran ayuda para la industria alimentaria presentaban ciertos inconvenientes a la hora de la obtención de resultados. La principal desventaja fue que los resultados obtenidos sólo son aplicables en condiciones experimentales y que, a su vez, para realizar cualquier cambio de estas condiciones es necesaria la repetición de la prueba. Por otro lado, en dicho trabajo se demostró cómo afecta la temperatura de almacenamiento a *L. monocytogenes* con modelos probabilísticos, ya que tenía en cuenta los parámetros que afectan al crecimiento del patógeno, y por lo tanto, predecía de manera más acertada los resultados.

Otro estudio aplicado en este ámbito es el realizado por Polese *et al.* (2014), donde se utilizan varios modelos predictivos simplificados de crecimiento y no crecimiento de *Listeria monocytogenes*, para determinar su comportamiento durante el procesado y almacenaje de un producto RTE cárnico tradicional italiano, todo ello acorde la C.E. N° 2073/2005.

Dentro de los productos cárnicos RTE más cotidianos encontramos el jamón cocido y fiambre de jamón, la paleta cocida y fiambre de paleta, y el magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo, estos alimentos suelen recibir tratamientos térmicos durante los procesos de manufacturación u otros métodos eficaces para eliminar *L. monocytogenes*. No obstante, puede ocurrir una recontaminación por contaminación cruzada durante la manipulación, corte o empaquetado del producto (Patterson *et al.* 2010). De igual forma, estos mismos productos son almacenados bajo condiciones de refrigeración, y bajo niveles adecuados de a_w y pH, produciéndose una reducción de los organismos competitivos de *Listeria monocytogenes*, permitiendo su proliferación (Samelis y Metazopoulos, 1999).

El objeto final de las técnicas de control específico es la eliminación total o parcial de *L. monocytogenes*, o procurar conseguir el retraso máximo su crecimiento los procesos de manipulado de estos productos. Se han desarrollado técnicas no térmicas como es el tratamiento por altas presiones (HHP), radiación, envases al vacío, pulsos eléctricos de alta intensidad, y ultrasonidos, entre otros (Chen *et al.* 2012). En el método

HHP el alimento es tratado con su envase final y se le aplica uniformemente altos niveles de presión hidrostática durante unos minutos, inhibiendo el crecimiento de bacterias, no obstante, permite preservar la calidad de las propiedades organolépticas del alimento (Buzrul, 2014).

Varios estudios, se han centrado en la evaluación del comportamiento de *L. monocytogenes* en alimentos cárnicos RTE con este tipo de técnica, lo que ha beneficiado la generación de modelos de inactivación bajo este tipo de condiciones específicas. (Bover-Cid *et al.*, 2011a, Doona *et al.*, 2012, Koseki y Yamamoto, 2007, Hereu *et al.* 2012). En el trabajo de Hereu *et al.* (2014) se consideró que en los modelos anteriores que evaluaban la inactivación de *L. monocytogenes* no consideraban las condiciones cinéticas de crecimiento durante el posterior almacenamiento, a consecuencia de ello, realizaron una evaluación modelos logísticos sopesando las condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas en jamón cocido y la mortadela.

3.3 Medidas higiénicas y caracterización de riesgo e integración de temperatura en productos cárnicos.

La importancia de un buen control de los microorganismos, tanto deteriorantes como patogénicos, radica en la higiene y el conocimiento de los factores que permiten su desarrollo y establecimiento, a consecuencia de ello, la mayoría de las actividades de la cadena de producción requieren programas de higiene para el tratado de la carne. Estos programas suelen englobar bloques como, el ya conocido sistema APPCC y la evaluación cuantitativa de riesgo y por último, se hace necesaria la implantación de una guía de Buenas Prácticas de Elaboración (GHP, en inglés Good Hygienic Practice) de los alimentos, siendo este el único componente que no trata la inocuidad del producto sino del ambiente en el que será tratado, proporcionando a los operarios de las empresas, unas correctas medidas de limpieza y desinfección de todas aquellas superficies que puedan estar en contacto directo con el alimento.

Particularmente, la Organización de las Naciones Unidas de Alimentación y Agricultura, elaboró un estudio para la estimación del riesgo de *Campylobacter spp.* en pollos, donde en cada uno de los módulos de la cadena de producción se evaluaba, con modelos de crecimiento y de estimación de riesgo, su presencia y prevalencia (Figura 1), proporcionando guías y recomendaciones para las industrias de este sector. En las etapas de la cadena se utilizaron elementos del modelo de una complejidad variable, los cuales pueden ser modificados para la toma de decisiones en un contexto particular. Un

ejemplo de ello, es la generación de un modelo, dentro del módulo de crianza, que proporcione un cálculo detallado de prevalencia y colonización de *Campylobacter* en una parvada de pollos. Los evaluadores y gestores de riesgos de las empresas alimentarias pueden emplear el modelo como un base de pruebas determinadas, para la obtención de ideas de cómo el sistema podría ser gestionado y, cómo el sistema reacciona a diversos cambios. (FAO, 2009)

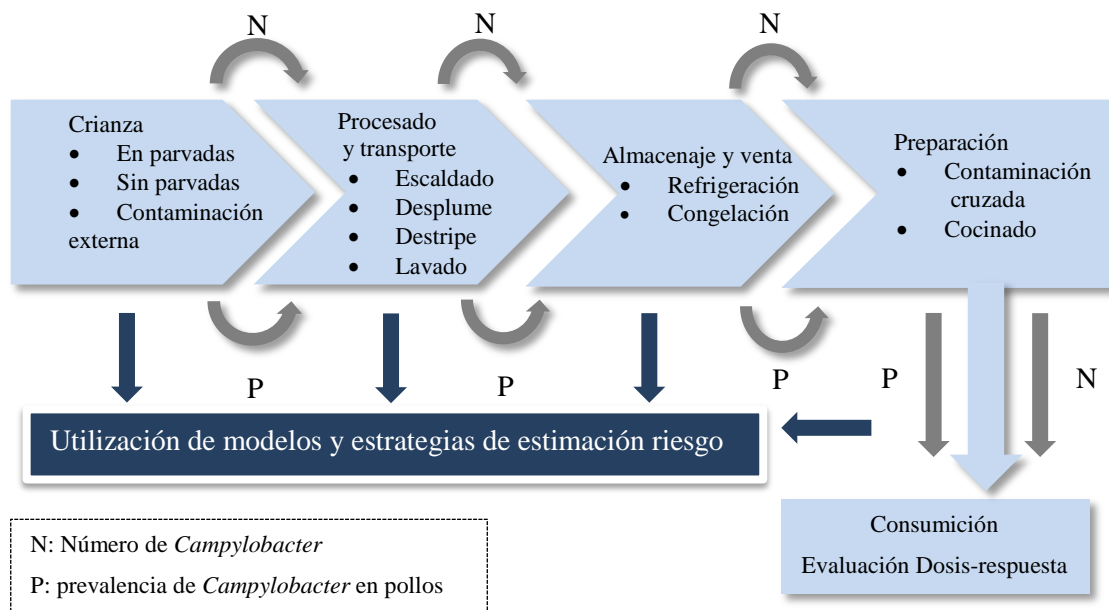


Figura1: Esquema de la valoración de exposición de *Campylobacter* en pollos Broiler.

No obstante, además de la higiene, la temperatura juega un papel importante en el procesado, almacenamiento y distribución de estos alimentos. La vida útil está determinada por los efectos acumulativos de la temperatura durante toda la cadena de producción, donde el descontrol de este factor favorece notablemente el desarrollo microbiológico, causando una pérdida de calidad y llegando a generar riesgos en la salud del consumidor (Ray, 2004). Debido a ello es necesario llevar un control de la cadena de frío para evitar mermas de la vida útil del producto, que a su vez conlleva a pérdidas económicas por su mala comercialización y por desconfianza del consumidor (Tirado *et al.* 2009)

El uso de la microbiología predictiva permite la elaboración de modelos compuestos, cuya finalidad es predecir con veracidad el crecimiento y, asimismo, la estimación del estado de un producto almacenado a distintos rangos de temperatura, no solo durante su distribución o comercialización, sino también después de haber sido

sometidos a tratamientos térmicos (Smith-Simpson y Schaffner, 2005). Varios estudios representados en la Tabla 7, describen modelos desarrollados para la comprobación del efecto de la temperatura en el crecimiento y desarrollo de diversos microorganismos patógenos o alterantes, en productos cárnicos.

Título	Autor
The growth of microorganisms on ox muscle.	Scott, 1937
Growth of <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> and <i>Yersinia enterocolitica</i> on cooked mussel tissue under refrigeration and mild temperature abuse	Hudson, 1994
Predictive model for growth of <i>Clostridium perfringens</i> at temperatures applicable to cooling of cooked meat.	Juneja <i>et al.</i> , 1999
Dynamic computer simulation of <i>Clostridium perfringens</i> growth in cooked ground beef.	Huag, 2003
Development of a predictive growth of <i>Clostridium perfringens</i> in cooked beef during cooling.	Smith-Simpson y Schaffner, 2005
Predictive model for growth of <i>Clostridium perfringens</i> in cooked cured pork.	Juneja <i>et al.</i> 2006
Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions.	Mataragas <i>et al.</i> 2006
Probabilistic models for the prediction of target growth interfaces of <i>Listeria monocytogenes</i> on ham and turkey breast products.	Yoon <i>et al.</i> 2011
General Regression Neural Network Model for behavior of <i>Salmonella</i> on chicken meat during cold storage.	Oscar, 2014
A predictive growth model of <i>Aeromonas hydrophila</i> on chicken breasts under various storage temperatures.	Yang <i>et al.</i> , 2016

Tabla7: Ejemplo de artículos científicos de microbiología predictiva relacionados con los efectos de la temperatura en productos cárnicos.

4. Conclusiones

La microbiología predictiva es una herramienta de predicción y determinación microbiológica muy potente, con un consecuente impacto en la industria alimentaria. Ésta junto a las innovaciones tecnológicas del mundo actual, como los sistemas de software y monitorización, permite que la microbiología predictiva disponga de una amplia gama de aplicaciones como, la generación de diseños experimentales, aportando conocimientos sobre la cinética de los microorganismos, la generación de estrategias, métodos, y guías para la prevención de riesgo microbiológico en la industria alimentaria, en especial, en el sector cárnico, permitiendo a los operarios que intervienen en todas y cada una de las etapas de la cadena alimentaria, la optimización de tiempo y trabajo. Asimismo, aporta continuos conocimientos a la comunidad científica los cuales permiten seguir ampliando los horizontes de la microbiología predictiva en el desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria.

5. Conclusion

Predictive microbiology is a powerful predictive tool and microbiological determination, with a consequential impact on the food industry. This knowledge with the technological innovations of the contemporary world, with software systems and monitoring, allows predictive microbiology available a wide range of applications such as the generation of experimental designs, providing knowledge on the kinetics of microorganisms, generate strategies, methods, and guidelines for the prevention of microbiological risk in food industry, especially in the meat sector, allowing operators involved in every stage of the food chain, optimizing time and work . It also provides continuous knowledge to the scientific community allow to increase the perspectives of predictive microbiology in the development of new products in the food industry.

6. Referencias bibliográficas

- Baranyi, J. & Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal on 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 (9): 1967–1971.
- Boonyawantang, A., Mahakarnchanakul, W., Rachtanapun, C., Boonsupthip, W. 2012. Behavior of pathogenic *Vibrio paragaemolyticus* in prawn in response to temperature in laboratory and factory. *Food Control*. 26:479-485.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. 2011a. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology*. 28, 804–809
- Buchanan, R.L. 1993. Predictive food microbiology. *Trends of Food Science Technology*. 4: 6-11.
- Buchanan, R.L. y Klawitter, L.A. 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 12(2-3): 235-245
- Buchanan, R.L., Smith, J. L, McColgan, C., Marnier, B.S., Golden, M.H y Dell, B. 1993. Response Surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphilococcus aureus*. *Journal of Food Safety*. 13:159-175.
- Buchanan, R. L., Whiting, R. C. 1996. Risk Assessment and Predictive microbiology. *Journal of Food Protection*. Supplement: 31-36.
- Buzrul, S. 2014. Multi-pulsed high hydrostatic pressure inactivation of microorganisms: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Revista Peer Reviewed 26:1-11.
- CAC (*Codex Alimentarius Commission*), 1993. Guidelies for the Application of the Hazard Analysis Critical Control Point System, *Codex Alimentarius* (CCFH) Alinorm 93/13A-Appendix II, FAO, Rome.
- CCFH (*Codex Committee on Food Hygiene*), 2000. Proposed Draft Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Management at Step 3. *Joint FAO/Who food Standards Programme, Codex Committee on Food Hygiene*. CX/FH 00/06. FAO.
- Chasseignaux E., Gerault P., Toquin, M. T., Salvat G., Colin, P., Ermel, G. 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and war pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters*. 210:271-275.
- Chen, J.H., Ren, Y., Seow, J., Lui, T., Bang, W.S., Yuk, H. G. 2012. Intervention technologies for ensuring microbiological safety of meat: current and future trends. *Comprehesive reviews in food science and food science and food safety*. 11:119-132.
- Dalgaard P., Buch P., Silberg S., 2002. Seafood spoilage predictor-development and distribution of a product specific application software. *International Journal of Food Microbiology* 73: 343-9.
- Davey, K. R., 1993. A predictive model for combined temperature and water activity on the microbial growth during the growth phase. *Journal Applied Bacteriology*. 67:483-488.
- Delhalle L., Adolphe Y., Crèvecoeur S., Imazaki P., Daube G., and Clinquart A. 2001. A new tool to control meat product safety: a web based application of predictive microbiology models. *Life and Food Science*. 57th International Congress of Meat Science and Technology. Belgium. <http://hdl.handle.net/2268/105108>
- Devlieghere, F., Van Belle, B., Debevere, J., 1999. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *International Journal of Food Microbiology* 46: 57–70.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2000. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology* 58: 93– 106.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Vandewaetere, B., Van Impe, J., Debevere, J., 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology* 18: 53– 66.

- Doona, C.J., Feeherry, F.E., Ross, E.W., Kustin, K., 2012. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* by high-pressure processing: pressure and temperature variation. *Journal of Food Science*. 77, 458–465.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R., y Montville, T. J. 2000. Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana. En: Microbiología de los alimentos. Fundamentos y Fronteras., Ed. S.A. Acribia. Zaragoza, España. 13- 30.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2007. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. *EFSA Journal* 599:1-49.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2014. European Union summary report. Trends and sources of zoonoses, zoonotic agentes and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*. 12(2):3547.
- Esser, D. S., Leveau J. H. J., Meyer K. M. 2015. Modeling microbial growth and dynamics. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 99:8831-8846.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2006. Guidance to Governments on the Application of HACCP in Small And/or Less-developed Food Businesses. (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0799e/a0799e00.pdf>)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2009. Risk Assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens. Interpretativ summary. *Microbiological Risk Assessment Series*. Geneva. 11:35. (http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jemra/MRA_11.pdf)
- forsythe, f. j. 2002. The microbial risk assessment of foods. Capítulo 2, sección 2.7 Oxford, UK: Blackwell.
- Fu, B., and T. Labuza. 1993. Shelf life prediction: Theory and application. *Food Control*. 4: 125–133.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., Cenens, C., Van Impe, J. F. 1998. Application of artificial neural networks as a non-linear technique to describe bacterial growth in chilled food products. *International Journal of Food Microbiology*. 44: 49-68.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Devlieghere, F., Bernaerts, H., Debevere, J., Van Impe, J.F., 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology*. 91: 229–244.
- Glass, K., Fearnley, E., Hocking, H., Raupach, J., Veitch, M., Ford, L., Kirk, M.D. 2016. Bayesian source attribution of Salmonellosis in South Australia. *Risk Analysis*. 36:561-570.
- Gordon L, R, 2009. Food packaging and shelf life. Capítulo1. Taylor and Francis Group, LLC. 10-16.
- Gómez, D., Iguácel, L. P., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Ariño A., Yangüela, J. 2015. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat meat products and meat processing plants in Spain. *Foods*. 4:271-282.
- Halder, A., Black, D. G., Davidson, P. M., Datta, A. 2010. Development of associations and kinetic models for microbiological data to be used in comprehensive food safety prediction software. *Journal of Food Science*. 74:107-120.
- Hereu, A., Dalggaard, P., Garriga, M., Aymerich, T., Bover-Cid, S. 2012. Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*. 16:305-315.
- Hsi, D. J., Ebel, E. D., Williams, M. S., Golden, N. J., Schlosser, W.D. 2015. Comparing foodborne illness risks among meat commodities in the United States. *Food Control*. 54:353-359.
- Huang, L. 2003. Dynamic computer simulation of *Clostridium perfringens* growth in cooked ground beef. *International Journal of Food Microbiology* 87:217-227.
- Hudson, J. A., Avery, S. M. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cooked mussel tissue under refrigeration and mild temperature abuse. *Journal of Food Safety* 14(1):41-52.
- IFST, Institute of food science and technology. 1993. Shelf life of foods: Guidelines for its determination and prediction. London: Institute of Food Science & Technology. 66-71.
- Juneja, V.K., Huang, L., Thippareddi, H.H. 2006. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* in cooked cured pork. *International Journal of Food Microbiology*. 110:85-92.

- Juneja, V.K, Whiting, R.C., Marks, H.M., Snyder, O.P. 1999. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meat. *Food Microbiology*. 16:335-349.
- Junghyun, P., Myunghee, K. 2013. Comparison of dry medium culture plates for mesophilic aerobic bacteria in milk, ice cream, ham, and codfish fillet products. *Preventive Nutrition and Food Science*.18(4):269-272
- Koseki, S., Mizuno, Y., Yamamoto, K., 2007. Predictive modelling of the recovery of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked ham after high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*. 119, 300–307.
- Koutsoumanis, K., y Angelidis, A.S. 2007. Probabilistic modeling approach for evaluating the compliance of ready-to-eat foods with new European Union Safety Criteria for *Listeria monocytogenes*. *Applied Environment Microbiology*. 73:4996-5004.
- Koutsoumanis P. K., Aspidou, Z. 2016. Individual cell heterogeneity in Predictive Food Microbiology: Challenges in predicting a “noisy” world. *International Journal of Food Microbiology*. En prensa.
- Labuza, T. P., Fu, B. & Taoukis, P. S. 1992. Prediction for shelf life and safety of minimally processed CAP/MAP chilled foods: A review. *J. Food protection*. 55:741-750.
- Lan, Y., Shang, Y., Song, Y., Dong, Q., 2016. Changes in the quality of superchilled rabbit meat stored at different temperatures. *Meat Science*. 117:173:181.
- Lansgsrud, S., Moen, B., Moretro, T., Loype, M., Heir., E. 2016. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *Journal of Applied Microbiology*. 120:366-378.
- Lebert I., Robles-Olvera V., Lebert A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*. 61: 27-39.
- Martin, B. Perich, A., Gómez, D., Yangüela, J., Rodríguez, A., Garriga, M., Aymerich, T. 2014. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiology*. 44: 119-127.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. 2006. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science*. 71:157-167.
- McDonald, K., Sun, D. W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: A review. *International journal of food microbiology*. 52: 1-27.
- McMeekin, T.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: providing acknowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*. 78: 133-153.
- McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T., y Ratkowsky, D. A. 1993. Predictive Microbiology: Theory and Application. John Wiley & Sons, New York, 87-115.
- Menbré, J. M. & Lambert, R. 2008. Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*. 128: 10-15.
- Miles, D.W. y Ross, T. 1999. Identifying and quantifying risks in the food production chain. *Food Australia*. 51.
- Mortimore, S. y Wallace, C. 2013. HACCP A Practical Approach. 3° Edition. Ed. Springer.
- Nauta, M. J., Jacobs-Reitsma, W. F., Havelaar, A. H., 2007. A risk assessment model for *Campylobacter* in broiler meat. *Risk Analysis*. 27(4):845-861.
- nørnung, b, andersen, j. k. & buncic, S 2009, Main concerns of pathogenic microorganisms in meat: Safety of meat and processed meat. Capitulo 1, Ed. F Toldrá. Springer Science+Business Media B.V. New York., 3-29. Food Microbiology and Food Safety.
- Oomes, S.J.C.M., va Zuijlen, A.C.M., Hehenhamp, J.O., Witsenboer,H., van der Vossen, J.M.B.M., Brul, S., 2007. The characterization of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 85–94.
- Oscar, Thomas P. 2014. General regression neural network model for behavior of *Salmonella* on chicken meat during cold storage. *Journal of Food Science*. 79:978-987
- Patterson, M.F., McKay, A.M., Connolly, M., Linton, M. 2010. Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures. *Food Microbiology*. 27, 266–273.
- Perez-Rodriguez, F., y Zwietering, M. H. 2012. Application of the Central Limit Theorem in microbial risk assessment: High number of serving reduces the coefficient of variation of food-borne burne-of-illnes. *International Journal of Food Microbiology*.

- Pin C., Avendaño-Perez, G., Cosciani E., Gómez N., Gounadakic, A., Nychas, G., Skandamis P., Barker, G. 2011. Modeling *Salmonella* concentration throughout the pork supply chain by considering growth and survival in fluctuating conditions of temperature, pH and a_w . *International Journal of Food Microbiology* 145: 96-102.
- Pin, C., Velasco de Diego, R., George, S., García de Fernando, G. D., and Baranyi, J. 2004. Analysis and validation of a predictive model for growth and death of *Aeromonas hydrophila* under modified atmospheres at refrigeration temperatures. *Applied Environment Microbiology* 70(7): 3925-3932.
- Podpecân, B.A., Pengov, S.V. 2007. The source of contamination on ground meat for production of meat products with bacteria *Staphylococcus aureus*. *Slovenian Veterinary Research*, 44:25-30
- Raseta, M., Djordjevic, Vesna., Vidanovic, D. 2015. Contamination Routes of *S. infantis* in food chain of broiler meat production and it is significance for public health. *Procedia Food Science*. 5:254-257.
- Polese, P., Del Torre, M., Venir, E., Stecchini, M. L. 2014. A simplified modelling approach established to determinate the *Listeria monocytogenes* behaviour during processing and storage of traditional (Italian) ready-to-eat food in accordance with the European Commission Regulation N° 2073/2015. *Food Control*. 36:166-173.
- Ratkowsky. D. A., Olley, J., Ross, T. 2005. Unifying temperature effects on the growth rate of bacteria and the stability of globular proteins. *Journal Theoretical Biology* 233: 351-62.
- ray, b., 2004. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. Tercera edicion. Capitulo 33, 467-475.
- Roberts, T. A. 1989. Combinations of antimicrobials and processing methods. *Food Technology* 43:156-163.
- Rodríguez, P. M. R. 2003. Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. Tesis Doctoral. Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba.
- Roels, J. A., y Kossen, N.W.F. 1978. On modeling of microbial metabolism. *Progress in Industrial Microbiology* 14:95-203.
- Ross, T., Ratkowsky D. A., Mellefont L. A., McMeekin T. A. 2003. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* . 82: 33-43.
- Samelis J., Metazopoulos, J. 1999. Incidence and principal sources of *Listeria spp.* And *Listeria monocytogenes* combination in processed meats and meat processing plant. *Food Microbiology* 16:465-477.
- Schaffner, D. W. and Labuza, T. P. 1997. Predictive microbiology: Where are we, and where are we going. *Food Technology*. 51(4): 95–99.
- Scott, W. 1937. The growth of microorganisms on ox muscle. II: The influence of temperature. *J. Council Scient. Ind. Res. Australia*, 9: 177-190.
- Shearer, A.E.H., Neeto, H. S., Chen H. 2010. Effects of growth and recovery temperatures on pressure resistance of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 136:359-363.
- Sheen, S. 2008. Modeling surface transfer of *Listeria monocytogenes* on Salami during slicing. *Journal of Food Science*. 73:304-311.
- Shimoni, E., Labuza, T. P. 2000. Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. *Food Science and Technology*. 11:394-402.
- Skinner, G.E. and Larkin, J.W. 1994. Mathematical modeling of microbial growth: a review. *Journal on Food Safety*. 14: 175-217.
- Smith-Simpson, S.; Schaffner, D. W. 2005. Development of a predictive growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef during cooling. *Journal of Food Protection* 68(2): 336-341.
- Soman, R. and Raman, M. 2016. HACCP system-hazard analysis and assessment, based on ISO22000:2005 methodology. *Food Control*. 69:191-195.
- Sumner J., Krist K. 2002. The use of predictive microbiology by Australian meat industry. *Int. J. Food Microbiology*. 73: 363-366.
- Tirado, J., Paredes, D., Velazquez, G., Torres, J. A. 2009. Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(1):66-76.
- Tyrovouzis, N. A., Angelidis, A. S., Stoforos, N. G. 2014. Bi-phasic growth of *Listeria monocytogenes* in chemically defined medium at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 186:110-119.

- Valero, A., Aplicaciones de modelos predictivos en evaluación de riesgos *Listeria monocytogenes* en alimentos minimamente procesados. 2006. Tesis Doctoral. Dept de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba: Córdoba. 362.
- Van Impe, J. F., Poschet, F., Geeraerd A. H., Vereecken, K. M. 2005. Towards a novel class of predictive microbial growth models. *International Journal of Food Microbiology*. 100:97-105.
- Whiting, R.C. 1995. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science Nutrition* 35(6): 464-494.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L. 1993. A classification of models for predictive microbiology, *Food Microbiology*. 10: 175-177.
- Whiting, R. C., Buchanan, R. L. 1994. Microbial Modeling. *Food Technology*. 48(6):113-120
- wolffs p., radstrom p. 2006. Real-time PCR for the detection of pathogens in meat. Capítulo 6: Advanced Technologies for Meat Processing, L.M.L. Nollet y F. Toldrá, Ed. Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker, pp. 131- 154.
- Yang, S., Park, S.Y., Ha, S.D. 2016. A predictive growth model of *Aeromonas hydrophila* on chicken breasts under various storage temperatures. *LWT-Food Science and Tecnology*.69:98-103.
- Yoon, Y., Geornaras, I., Scanga, J. A., Belk, K. E., Smith, G.C., Kendall, P.K., Sofos, J.N. 2011. Probabilistic Models for the Prediction of Target Growth Interfaces of *Listeria monocytogenes* on Ham and Turkey Breast Products. *Journal on Food Science*. 79:450-455.
- Zhou, K., Zhong, K., Long, C., Han, X., Lui S., 2014. Development and validation of a predictive model for the growth of *Salmonella enterica* in chicken meat. *Journal Food Safety*. 34(4): 329-332. Peer Reviewed.
- Zurera G., García-Gimeno R. M., Rodríguez-Pérez M. R., Hervás C. 2006. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. *Food Control*. 17: 429-438.
- Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts, F. M., Van't Riet K., 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Applied Environment Microbiology* 56: 1875–1881.

Páginas Webs consultadas

1. Pathogen Modeling Program <http://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx#nogo>. (02/16)
2. Página de descarga del PMP <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550> (02/16)
3. Food Spoilage Safety Program <http://fssp.food.dtu.dk/default.aspx> (03/16)
4. ComBase <http://www.combase.cc/> (02/16)
5. MicroHibro <http://www.microhibro.com> <http://www.hibro-uco.es/> (02/16)
6. *Listeria* Model control 2012 <https://lcm.purac.com/index.php> (03/16)
7. <https://www.campdenbri.co.uk/services/microbiology.php> (07/16)
8. Sym Previus <http://symprevius.eu/en/> (02/16)
9. Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de marzo de 2000 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. (<https://www.boe.es/doue/2000/109/L00029-00042.pdf>) (09/16)
10. Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (09/16) (<https://www.um.es/casan/documentos/legislacion/ALIMENTARIA/CRITERIOS%20MICROBIOLÓGICOS/reglamento-2073-2005.pdf>) (08/16)
11. Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión de 5 diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (<http://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/reglamento1441-2007.pdf>). (08/16)
12. Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de Abril de 2004 por lo que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:ES:PDF>). (07/16)
13. Reglamento (CE) nº 356/2010 de la Comisión de 28 de abril de 2010 por el que se modifica el reglamento (CE) nº 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que respecta a las enterobacteriáceas en la leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos pasteurizados y a *Listeria monocytogenes* en la sal de cocina. (<https://www.boe.es/doue/2010/107/L00009-00011.pdf>). (07/16)
14. Reglamento (CE) nº 1086/2011 de la Comisión de 27 de octubre de 2011 por el que modifican el anexo II del Reglamento (CE) nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo I

- del Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión en lo que concierne a la salmonela en la carne fresca de aves de corral ([http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/legislacion/R\(UE\)_10862011_CRITERIOS_MICROBIOLOGICOS_tcm7-180664.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/legislacion/R(UE)_10862011_CRITERIOS_MICROBIOLOGICOS_tcm7-180664.pdf)). (08/16)
15. Reglamento (CE) nº 217/2014 de la Comisión de 7 de marzo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a la Salmonella en las canales de porcino. (<https://www.boe.es/doue/2014/069/L00093-00094.pdf>) (07/16)
 16. Informe de consumo alimentario del Gobierno de España http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf (06/16)
 17. Sistemas ACCPP http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10913%3A2015-sistema-haccp-siete-principios&catid=7889%3Ahaccp-sistema&Itemid=41452&lang=es (08/16)
 18. Lista de reglamentos: http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/*/*/*normictb.htm (08/16)