



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
Centro de Estudios de Postgrado

## Trabajo Fin de Máster

# CRECIMIENTO E INACTIVACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* A TRAVÉS DE HERRAMIENTAS DE MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN PRODUCTOS CÁRNICOS CRUDOS-CURADOS Y COCIDOS

**Alumno/a:** CUESTA BERTOMEU, INMACULADA DE LOS SANTOS

**Tutor/a:** ELENA ORTEGA MORENTE/ ELENA CARRASCO JIMÉNEZ  
Dpto: Ciencias de la Salud (Área de Microbiología)  
Universidad de Jaén y Bromatología y Tecnología de los  
Alimentos Universidad de Córdoba

**JULIO, 2021**

## Índice:

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| <b>RESUMEN</b> .....                      | 2  |
| <b>SUMMARY</b> .....                      | 2  |
| Índice de Figuras, Gráficos y Tablas..... | 4  |
| Abreviaturas.....                         | 5  |
| <b>1.- Introducción</b> .....             | 6  |
| <b>2.- Objetivos</b> .....                | 19 |
| <b>3.- Material y métodos:</b> .....      | 20 |
| <b>3.- Resultados y discusión:</b> .....  | 24 |
| a) CHORIZO FORMATO VELA.....              | 24 |
| b) SALAMI .....                           | 33 |
| c) JAMÓN COCIDO EXTRA .....               | 36 |
| <b>4.- Conclusiones:</b> .....            | 39 |
| <b>5.- Bibliografía:</b> .....            | 40 |

## RESUMEN

La listeriosis es una enfermedad transmitida por los alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* y es en los alimentos listos para el consumo donde radica la mayor preocupación en Salud Pública debido a la cantidad de brotes que se producen anualmente por el consumo de estos alimentos. Esta bacteria ubicua se caracteriza por una gran resistencia al medio pudiendo persistir en la industria durante años.

Los productos cárnicos crudos-curados y cocidos por su proceso de fabricación se consideran alimentos con poca probabilidad de causar riesgo de listeriosis en la población pero todos los años se detecta positivos a *Listeria monocytogenes* en muestras oficiales superando los límites legales para su comercialización.

En este trabajo se usan distintas herramientas de predicción microbiológica para estos tipos de productos cárnicos con el fin de poder visualizar el comportamiento de *Listeria monocytogenes* bajo determinados factores intrínsecos de productos cárnicos elaborados por una empresa cárnica de Jaén.

**Palabras Claves:** *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, producto cárnico curado, producto cárnico cocido, Chorizo, Salami, Jamón, microbiología predictiva.

## SUMMARY

Listeriosis is a disease transmitted by food contaminated by *Listeria monocytogenes* and it is in ready-to-eat food that the greatest public health concern lies because of the number of outbreaks that occur annually from the consumption of these food. This ubiquitous bacterium is characterized by great resistance to the environment and can persist in the industry for years.

Raw meat products-cured and cooked by its manufacturing process are considered foods with little probability of causing risk of listeriosis in the population but every year positive samples for *Listeria monocytogenes* are detected in official samples, exceeding the legal limits for its marketing.

In this work different microbiological prediction tools are used for these types of meat products in order to visualize the behavior of *Listeria monocytogenes* under certain intrinsic factors of meat products made by a meat industry from Jaén.

**Keywords:** *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, dry fermented sausages, cooked meat product, Chorizo, Salami, Ham Pork, Predictive microbiology.

## Índice de Figuras, Gráficos y Tablas

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> Representación de los escenarios que puedan darse durante la vida útil de los alimentos .....          | 12 |
| <b>Figura 2.</b> Curva de crecimiento microbiano tipo para una población bajo condiciones ambientales constantes ..... | 13 |
| <b>Figura 3.</b> Determinación de percentiles en una distribución normal .....                                         | 22 |
| <b>Figura 4.</b> Condiciones de Predicción basado en Seman et al. (2002) para MicroHibro© .....                        | 23 |
| <b>Figura 5.</b> Variables necesarias para hacer la predicción de crecimiento con DMRI. ....                           | 23 |
| <b>Figura 6.</b> Buscador de modelos mediante árbol de alimentos (MicroHibro©) .....                                   | 26 |
| <b>Figura 7.</b> Modelos microbianos para alimento crudo-curado y parámetros cinéticos (MicroHibro©).....              | 26 |

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfica 1.</b> Modelo de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> a concentraciones iniciales 0 y 1 log10 en producto cárnico curado (MicroHibro) ..... | 27 |
| <b>Gráfica 2.</b> Inactivación de <i>Listeria monocytogenes/innocua</i> a temperaturas (5,7,12°C), pH 4,8 y Aw 0,86 al inicio de la vida útil.....             | 35 |
| <b>Gráfica 3.</b> Inactivación de <i>Listeria monocytogenes/innocua</i> a temperaturas (5,7,12°C), pH 4.63 y Aw 0.79 al final de la vida útil.....             | 35 |
| <b>Gráfica 4.</b> Modelo predictivo de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en el jamón cocido realizado con DMRI-PREDICT.....                         | 38 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Factores intrínsecos que impactan en el crecimiento y supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> (Fuente: Guía de estudios de vida útil para <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos listos para consumo, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, 2012) .....                                                                                                                                                                                | 8  |
| <b>Tabla 2.</b> Números de muestras oficiales analizadas positivas en productos cárnicos para detección de <i>Listeria monocytogenes</i> durante los años 2018-2019-2020 y primer cuatrimestre año 2021.<br>Fuente: Datos sin publicar aportados por el Laboratorio de Salud Pública de Jaén. ....                                                                                                                                                                           | 8  |
| <b>Tabla 3.</b> Tipo de productos muestreados oficialmente positivos a <i>Listeria monocytogenes</i><br>Fuente: Datos sin publicar aportados por el Laboratorio de Salud Pública de Jaén. ....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 9  |
| <b>Tabla 4.</b> Parámetros estimados para la distribución normal logarítmica (Log CFU/g) usada para describir la concentración inicial de <i>Listeria monocytogenes</i> en ALC en puntos de venta.<br>(Fuente: Closing gaps for performing a risk assessment on <i>Listeria monocytogenes</i> in ready-to-eat (RTE) foods: activity 2, a quantitative risk characterization on <i>Listeria monocytogenes</i> in RTE foods; starting from the retail stage, EFSA, 2017) ..... | 9  |
| <b>Tabla 5.</b> Temperatura y duración de cada etapa de la cadena de distribución de alimentos<br>Fuente: Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos, FEDACOVA, 2020.....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 13 |
| <b>Tabla 6.</b> Criterios de seguridad alimentaria para <i>Listeria monocytogenes</i> . Anexo I Reglamento (CE) 2073/2005 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 15 |
| <b>Tabla 7.</b> Caracterización del chorizo formato vela .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 20 |
| <b>Tabla 8.</b> Caracterización del Salami .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 21 |
| <b>Tabla 9.</b> Caracterización del Jamón cocido Extra .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 21 |
| <b>Tabla 10.</b> Condiciones de predicción para el chorizo vela .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 27 |
| <b>Tabla 11.</b> Datos aportados por la empresa de distintos lotes de fabricación de chorizo vela .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 29 |
| <b>Tabla 12.</b> Estimación del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en relación al tiempo de fabricación del chorizo vela.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 31 |
| <b>Tabla 13.</b> Metadatos: Función Primaria: Baranyi&Roberts (1994); Función Secundaria: Seman et al 2002.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 32 |
| <b>Tabla 14.</b> Niveles de reducción de concentración máxima y tiempo lag a temperaturas (5,7,12°C) al principio y al final de la vida útil .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 33 |

## **Abreviaturas**

**APPCC** (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos)

**ALC** (Alimentos listos para el consumo)

**A<sub>w</sub>** (Actividad agua)

**AFSCoE** (The Australian Food Safety Centre of Excellence)

**BAL** (Bacterias ácido lácticas)

**BfR** (Instituto Federal Alemán para el análisis de Riesgos)

**CFU** (Unidades Formadoras de Colonias)

**IFR** (The United Kingdom Institute of Food Research)

**USDA-ARS** (The United States Agricultural Research Service)

**PCCs** (Punto de Control Críticos)

## 1.- Introducción

La listeriosis es una enfermedad zoonótica cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes*, un bacilo grampositivo, anaerobio facultativo, no formador de esporas y móvil. El género *Listeria* tiene seis especies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* y *Listeria marthii*. De ellas, las únicas patogénicas son *Listeria monocytogenes* para el hombre y animales y *Listeria ivanovii* para animales. De los 13 serotipos de *Listeria monocytogenes*, los serotipos 1/2a, 1/2b, 4b son los responsables de la mayoría de los casos clínicos.

Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida por la naturaleza y causa zoonosis especialmente en animales de rebaño. Se aísla en aguas residuales de ensilajes y del suelo y tiene una capacidad de supervivencia de hasta 295 días. (Torres K., Sierra S., Poutou R., Carrascal A., Mercado M., 2005).

La listeriosis es una enfermedad transmitida por los alimentos con gran repercusión en Salud Pública y está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (**Orden SSI/445/2015 de 9 de marzo**).

---

6

Los pescados ahumados, productos lácteos, productos cárnicos, verduras y frutas frescas son los alimentos principalmente implicados en brotes alimentarios causados por esta bacteria pero básicamente está muy relacionada con el consumo de alimentos listos para el consumo (ALC).

Según el **Reglamento (CE) 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios**, se define “los alimentos listos para su consumo” como “Alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos”.

Estos alimentos, la mayoría refrigerados, tienen una vida útil prolongada y la presencia de *Listeria monocytogenes* se suele relacionar con una recontaminación antes del envasado final, con la manipulación en el punto de venta o en el hogar del consumidor (Hwang C., Shiowshuh S., 2011). Tampoco se puede obviar las tendencias actuales en el consumo de alimentos ya que los hábitos están cambiando hacia el consumo de alimentos que antes se

cocinaban y ahora no. (Muñoz A.I, Vargas M,Otero L,Díaz G,Guzmán V., 2011). Como es el caso de comer chorizos ligeramente cocinados o sin cocinar (Carrie M. Hew, Maha N. Hajmeer, Thomas B. Farver, James M. Glover, Dean O. Cliver, 2005).

El género *Listeria* es capaz de crecer a temperaturas de 0°C, por lo que hay que tener en cuenta su facilidad de proliferación en alimentos refrigerados, así como su capacidad de resistencia en ambientes y/o matrices alimentarias estresantes como las que se aprecian en el procesamiento de alimentos salados o desecados (tabla 1). Así mismo, la bacteria puede crecer con ausencia o baja concentración de oxígeno por lo que el envasado al vacío puede no suponer un factor limitante para la proliferación de *Listeria* (Iñigo Nuñez S.,Jimenez Manso A., 2012). También se ha recogido en la literatura científica que existen subtipos de *Listeria monocytogenes* más termotolerantes que otro (Thévenot D., Dernburg A., Vernozy-Rozand C., 2006).

Simpson et al (2008) en su estudio estableció que 10<sup>4</sup> CFU/g de *Listeria monocytogenes* no fue inactivado durante el proceso de fermentación y secado, la bacteria patógena aún estaba presente con bajos niveles en salami después de 12 semanas de almacenamiento en refrigeración (4°C) envasado al vacío.

Esta bacteria, que tiene una gran capacidad de formar biopelículas en diversas superficies de la industria alimentaria, presenta una gran resistencia a diversas condiciones hostiles en la matriz alimentaria como son la acidez o las bajas temperaturas (< 10°C) por lo que el almacenamiento refrigerado no es garantía de protección frente al crecimiento de la *Listeria monocytogenes* (Kent M. Sorrells, Davin C. Enigl, John R. Hatfield, 1989) (Hospital X.F, Hierro E.,Fernández M, 2012).

Otros factores intrínsecos a tener en cuenta son la concentración de sal (ClNa) y la actividad de agua (a<sub>w</sub>) del alimento. Brotes de listeriosis en los que estaban implicados productos cárnicos curados y quesos han puesto de manifiesto la capacidad de crecimiento de esta bacteria en relación a estos factores. Se refieren varios estudios en laboratorio en los que a 10% (p/p) de ClNa y a diferentes niveles de a<sub>w</sub> tiene capacidad de crecimiento y a concentraciones de 13% durante 10 días se perdía dicha capacidad. También se indica que a altas concentraciones (30,5%) se reducía la supervivencia a los 5 días a temperatura de 37°C sin embargo a temperaturas bajas se perdía el efecto del ClNa (Nolan D.A., Chamblin D.C.,Troller J.A., 1992).

| Factores                                         | Puede crecer                                                                                                                                                                                                                                                                          |                     |                 | Puede sobrevivir *<br>(pero no crecer) |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------------|
|                                                  | Límite inferior                                                                                                                                                                                                                                                                       | Óptimo (más rápido) | Límite superior |                                        |
| Temperatura (° C)                                | -1.5 a +3.0                                                                                                                                                                                                                                                                           | 30.0 a 37.0         | 45.0            | -18.0                                  |
| pH **                                            | 4.2 a 4.3                                                                                                                                                                                                                                                                             | 7.0                 | 9.4 a 9.5       | 3.3 a 4.2                              |
| Actividad de agua<br>(a <sub>w</sub> )           | 0.90 a 0.93                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0.99                | > 0.99          | < 0.90                                 |
| Concentración de<br>sal (%) ***                  | < 0.5                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0.7                 | 12-16           | ≥ 20                                   |
| Atmósfera                                        | Anaerobio facultativo (puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno, p.e. en envases al vacío o en atmósfera modificada)                                                                                                                                                           |                     |                 |                                        |
| Tratamiento térmico<br>durante la<br>elaboración | Se requiere una combinación de temperatura/tiempo de 70° C durante 2 minutos para una reducción D-6 (es decir, 10 <sup>6</sup> o de 6 decimales) del número de células de <i>L. monocytogenes</i> . Otras combinaciones tiempo/temperatura también podrían lograr la misma reducción. |                     |                 |                                        |

\* El periodo de supervivencia variará dependiendo de la naturaleza del alimento y de otros factores.

\*\* La inhibición de *L. monocytogenes* dependerá del tipo de ácido presente.

\*\*\* Basada en el porcentaje de cloruro sódico, fase acuosa.

**Tabla 1. Factores intrínsecos que impactan en el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes***  
(Fuente: Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, 2012)

Asimismo, se ha demostrado que el efecto de un ambiente ácido sobre el crecimiento de esta bacteria puede estar influenciado no sólo por el pH sino por la concentración de sal y la temperatura. Se pudo constatar el efecto bactericida de diferentes ácidos que se emplean en alimentación era mayor a 30°C y disminuía este efecto, siendo bacteriostático a los 10°C (Conner D.E., Scott V.N., Bernard D.T., 1990).

Dentro de los alimentos listos para el consumo, los productos cárnicos curados y preparados cárnicos por sus características intrínsecas son considerados de bajo riesgo para producir listeriosis (Simpson C.A., Geornaras I., Yoon Y., Scanga J.A., Kendall P.A., Sofos J.N., 2008) (Thévenot D., Dernburg A., Vernozy-Rozand C., 2006). Pero es cierto que suele aparecer contaminación con relativa frecuencia en estos productos. En la tabla 2 y tabla 3 queda reflejado cómo desde los años 2018 a 2020 y parte del 2021 en muestreos oficiales en las provincias de Jaén y Córdoba dentro del Programa de Control de Peligros Biológicos, se han detectado productos cárnicos positivos a *L. monocytogenes* con un 1,05-1,76% en 2018, 2,41% en 2019, 0% (posiblemente debido a la menor recogida de muestra por la reducción de actividad debido al COVID-19) y 3 muestras positivas en lo que va del año 2021.

| Provincia | 2018                   |           |      | 2019                   |           |      | 2020                   |           |   | 2021                   |           |
|-----------|------------------------|-----------|------|------------------------|-----------|------|------------------------|-----------|---|------------------------|-----------|
|           | Nº Muestras analizadas | Positivas | %    | Nº Muestras analizadas | Positivas | %    | Nº Muestras analizadas | Positivas | % | Nº Muestras analizadas | Positivas |
| Jaén      | 95                     | 1         | 1,05 | 207                    | 5         | 2,41 | 89                     | 0         | 0 | Sin cuantificar        | 3         |
| Córdoba   | 113                    | 2         | 1,76 | 255                    | 0         | 0    | 90                     | 0         | 0 |                        |           |

**Tabla 2. Números de muestras oficiales analizadas positivas en productos cárnicos para detección de *Listeria monocytogenes* durante los años 2018-2019-2020 y primer cuatrimestre año 2021.**  
Fuente: Datos sin publicar aportados por el Laboratorio de Salud Pública de Jaén.

| 2018       | 2019                    | 2021                            |
|------------|-------------------------|---------------------------------|
| Salchichón | Butifarra               | Morcilla blanca de cedo y pollo |
|            | Salchichón              | Salchichón de cabezada          |
|            | Salchichón extra Jabalí | Chorizo de pavo                 |
|            | Chorizo oreado          |                                 |
|            | Salchichón casero       |                                 |

**Tabla 3. Tipo de productos muestreados oficialmente positivos a *Listeria monocytogenes***  
Fuente: Datos sin publicar aportados por el Laboratorio de Salud Pública de Jaén.

Los productos cárnicos, incluidos los embutidos fermentados, se contaminan frecuentemente con *Listeria* spp. Las especies no patógenas *L.innocua* y *L.welsbimeri* son indicadores de la presencia de *L.monocytogenes*. (Encinas J., Sanz J.,García-López ML.,Otero A., 1999), (Menéndez R.A., Rendueles E., Sanz J.J.,Capita R., García-Fernández C., 2015). De hecho, numerosos estudios indican su presencia, en embutidos italianos con una prevalencia de entre 9 y 45% y una concentración por debajo de 1 Log CFU/g y en casos esporádicos por encima de 3 Log CFU/g (Tirloni E., Di Pietro V.,Rizzi G.,Pomilio F.,Cattaneo P.,Bernardi C., Stella S., 2019). Simpson et al 2008, reporta un brote de un salami con una concentración de  $10^4$  CFU/g de *L. monocytogenes* que no se eliminó durante la fermentación o el proceso de secado y que permaneció durante 12 semanas a 4°C en envase al vacío.

9

En un estudio realizado por la EFSA sobre la evaluación del riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo se manifestó que en productos listos para la venta de embutidos se había encontrado una alta concentración de esta bacteria (1.598 UFC/g) y en cambio en productos cocinados se encontraron menores concentraciones (0,523 UFC/g) (tabla 4) (Pérez-Rodríguez F., Carrasco E., Bover-Cid S., Jofré A., Valero A., 2017).

| Food subcategory                 | Mean   | SD    | 50 <sup>th</sup> Perc. | 5 <sup>th</sup> Perc. | 95 <sup>th</sup> Perc. | LogL                  | AIC                  | BIC                  |
|----------------------------------|--------|-------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Cold smoked fish</b>          | 0.867  | 1.842 | 1.248                  | 0.394                 | 4.620                  | -1.50x10 <sup>3</sup> | 3.12x10 <sup>3</sup> | 3.14x10 <sup>3</sup> |
| <b>Hot smoked fish</b>           | -0.271 | 0.943 | 1.318                  | -0.511                | 1.593                  | -1.79x10 <sup>3</sup> | 3.59x10 <sup>3</sup> | 3.60x10 <sup>3</sup> |
| <b>Gravad fish</b>               | 1.011  | 1.931 | 1.236                  | 0.524                 | 4.950                  | -2.39x10 <sup>2</sup> | 4.83x10 <sup>2</sup> | 4.92x10 <sup>2</sup> |
| <b>Cooked meat</b>               | 1.100  | 2.119 | 1.241                  | 0.523                 | 5.453                  | -7.10x10 <sup>2</sup> | 1.42x10 <sup>3</sup> | 1.44x10 <sup>3</sup> |
| <b>Sausage</b>                   | 2.194  | 2.704 | 1.151                  | 1.598                 | 7.482                  | -3.22x10 <sup>1</sup> | 6.84x10 <sup>1</sup> | 7.53x10 <sup>1</sup> |
| <b>Pâté</b>                      | 1.461  | 2.334 | 1.213                  | 0.852                 | 6.240                  | -1.86x10 <sup>3</sup> | 3.73x10 <sup>3</sup> | 3.74x10 <sup>3</sup> |
| <b>Soft and semi-soft cheese</b> | 0.909  | 1.917 | 1.252                  | 0.389                 | 4.886                  | -3.14x10 <sup>2</sup> | 6.32x10 <sup>2</sup> | 6.46x10 <sup>2</sup> |

SD: standard deviation; Perc: percentile; LoL: Log-likelihood; AIC: Akaike Information Criterion; BIC: Bayesian Information Criterion.

**Tabla 4. Parámetros estimados para la distribución normal logarítmica (Log CFU/g) usada para describir la concentración inicial de *L. monocytogenes* en ALC en puntos de venta.**

(Fuente: Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 2, a quantitative risk characterization on *L. monocytogenes* in RTE foods; starting from the retail stage, EFSA, 2017)

La presencia de este patógeno en el producto final puede ser debido a una contaminación durante el loncheado o el envasado. La prevalencia en industrias cárnicas pequeñas españolas que producen embutidos tradicionales destaca por un alto nivel en las máquinas (11,8%), materia prima (28,95%) y producto terminado (15,8%) (Martin B, Garriga M., Aymerich T., 2011), (Encinas J., Sanz J., Garcia-López ML., Otero A., 1999).

*L. monocytogenes* tiene una capacidad de supervivencia muy larga en la industria cárnica una vez que aparece, algunos estudios apuntan por encima de 1 a 3 años (Thévenot D., Dernburg A., Vernozzy-Rozand C., 2006).

Los productos cárnicos refrigerados y mínimamente procesados cuando se someten a un tratamiento térmico moderado permanece con una microbiota residual significativa (Tirado J., Paredes D., Velazquez., Torres J.A., 2005).

Otro factor importante a tener en cuenta en la proliferación de *L. monocytogenes* es el periodo de vida útil. Según el *Codex Alimentarius* (CAC, 2007) se define como el período en que un alimento mantiene su seguridad microbiológica y unas condiciones adecuadas a una temperatura específica de almacenamiento y en su caso, bajo unas condiciones específicas de almacenamiento y manipulación.

---

10

Este periodo determina las fechas de consumo preferente o de caducidad de los alimentos. De hecho, el **artículo 2 del Reglamento 2073/2005** define a la vida útil como el periodo anterior a la fecha de duración mínima o la fecha de caducidad.

En los alimentos en que por sus condiciones intrínsecas como por ejemplo con  $a_w$  baja, muy ácidos o con alto contenido en azúcar o sal son considerados estables a temperatura ambiente, es decir, que el crecimiento bacteriano sea lento o bien porque haya sufrido un procesado que reduzcan los niveles microbiológicos y no tengan posibilidad de recontaminación, se marca la vida útil con la mención “fecha de consumo preferente”.

Para los alimentos que no van a sufrir un tratamiento térmico y por tanto no permite eliminar o reducir a un nivel aceptable el peligro de *L. monocytogenes* y permite su crecimiento, la marca de vida útil será con la mención “fecha de caducidad” tal como se indica en el **artículo 24 del Reglamento (UE) 1169/2011**.

Hay alimentos que desarrollan un rápido empeoramiento de sus características organolépticas por el crecimiento de microorganismos alterantes (Figura 1), sin que haya un crecimiento significativo de patógenos, entonces éstos se marcarán con la leyenda “fecha

de caducidad” como por ejemplo es el caso de la carne fresca. Pero cuando el deterioro es un proceso lento la vida útil se debería indicar con la mención “fecha de consumo preferente”, como es el caso del jamón serrano loncheado o el queso curado.

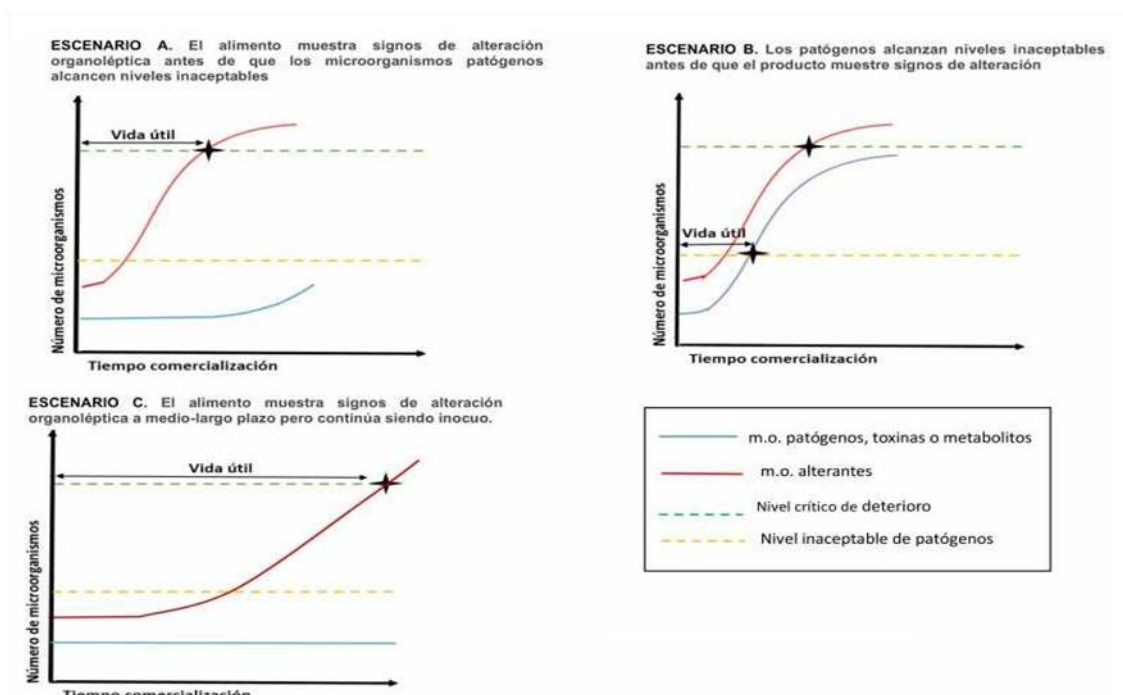
Se puede hacer distinciones entre la vida útil por calidad (por ejemplo la que viene determinada por microorganismos alterantes, es el caso de la fruta) y la vida útil segura de los alimentos (determinada por los microorganismos patógenos como es el caso de *Listeria* en ALC).

La vida útil está basada en:

- El desarrollo de determinados componentes químicos causantes de la alteración (p.ej. Histaminas en el pescado)
- El desarrollo de microorganismos patógenos que harían del alimento un producto no seguro.
- El desarrollo de microorganismos alterantes, como las BAL (Bacterias lácticas), levaduras-mohos o algunos microorganismos psicrótrofos.
- El desarrollo de atributos sensoriales (apariencia, olor, sabor, etc)

Los factores que influyen en la vida útil son los factores intrínsecos (que dependen del tipo de la materia prima y de la composición y formulación del producto) como son: aw, pH, potencial redox, oxígeno disponible, nutrientes y microbiota natural y de los factores extrínsecos (que dependen del proceso aplicado, condiciones sanitarias del proceso, el envasado, almacenamiento y distribución, la práctica de los consumidores) como son: perfil tiempo-temperatura, humedad relativa, exposición a la luz, contaminación microbiana, conservantes y composición de la atmósfera.

Estos factores influyen en la respuesta microbiana que es reproducible, cuantificable y predecible.



**Figura 1 Representación de los escenarios que puedan darse durante la vida útil de los alimentos**

Fuente: Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos. FEDACOVA. Valencia septiembre 2020.

El crecimiento de un microorganismo se representa a través de la curva del crecimiento (Figura 2) mostrando el logaritmo del número de microorganismos con respecto al tiempo bajo condiciones constantes favorables para el crecimiento (Garre Pérez A., Egea Larrosa J.A., Fernández Escámez P.S, 2016). Se establecen las siguientes fases en el crecimiento bacteriano:

1. Fase de latencia (Lag): Es una fase de adaptación al medio. Se corresponde con la primera parte de la curva y en la que el número de microorganismos permanece constante.
2. Fase logarítmica o exponencial: En donde los microorganismos se multiplican con rapidez con un crecimiento exponencial con ratio constante ( $\mu_{max}$ ).
3. Fase estacionaria: Es una fase en donde se estabiliza el crecimiento y no varía el nº de microorganismos.
4. Fase de muerte: En la que el número de microorganismos comienza a disminuir al consumirse todos los recursos del medio y/o acumularse tóxicos en el mismo.

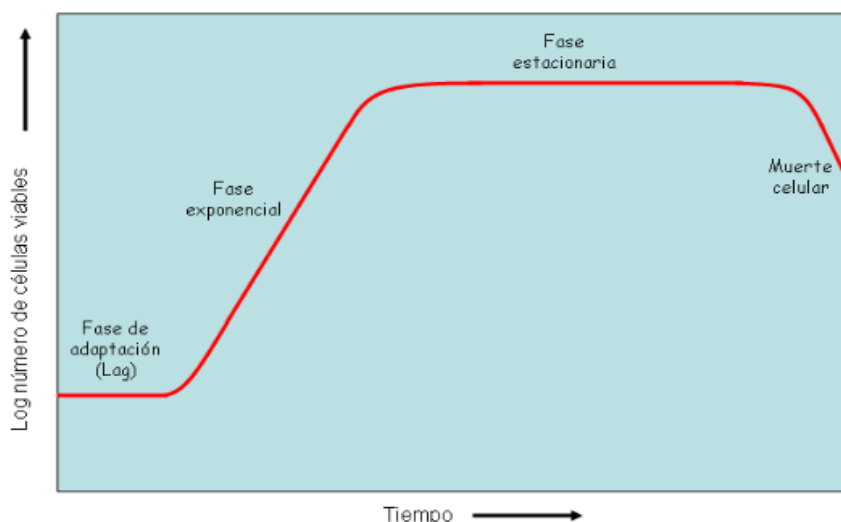


Figura 2. Curva de crecimiento microbiano tipo para una población bajo condiciones ambientales constantes

Por otro lado, es importante conocer la temperatura de distribución, de almacenamiento en el comercio y en el hogar porque son altamente influyentes en el crecimiento de este patógeno. (Iñigo Nuñez S.,Jimenez Manso A., 2012).

Dado que el fabricante indica la temperatura idónea en el etiquetado muchas veces se desconoce las temperaturas que muy probablemente alcanzarán. Por ello, la EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (versión 3, modificada 21/2/2019), recomienda que se hagan los estudios basándose en estudios de combinaciones de tiempo-temperatura como indica la tabla 5.

| Etapa de la cadena                                      | Temperatura                             |                   |      | Duración de la etapa                   |                   |                                    |                        |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|------|----------------------------------------|-------------------|------------------------------------|------------------------|
|                                                         |                                         |                   |      | Vida útil ≤ 21 días                    |                   |                                    | Vida útil > 21 días    |
| Desde la fábrica hasta la llegada al expositor de venta | Justificada por información detallada*  | O si no se conoce | 7°C  | Justificada por información detallada* | O si no se conoce | 1/3 de la vida útil total estimada | 7 días                 |
| Minorista: expositor de venta                           | Justificada por información detallada** | O si no se conoce | 7°C  | Justificada por información detallada* | O si no se conoce | 1/3 de la vida útil total estimada | ½ (vida útil – 7 días) |
| Conservación por el consumidor                          | Justificada por información detallada** | O si no se conoce | 12°C | Justificada por información detallada* | O si no se conoce | 1/3 de la vida útil total estimada | ½ (vida útil – 7 días) |

Temperatura justificada por información detallada:

\*El percentil 95 de la observación de datos propios obtenidos por la empresa.

\*\*El percentil 95 de las observaciones del país donde se localiza la etapa de la cadena de frío en consideración.

Tabla 5. Temperatura y duración de cada etapa de la cadena de distribución de alimentos

Fuente: Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos, FEDACOVA, 2020

De hecho, hay un estudio en el que se estableció que para predecir el abuso de la temperatura no es recomendable usar la temperatura promedio de almacenamiento puesto que subestima el efecto de los abusos de temperatura sobre la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Tirado J., Paredes D., Velazquez., Torres J.A., 2005).

Igualmente en otro trabajo científico se indicó que hay una gran variabilidad ( $>10^{\circ}\text{C}$ ) en las temperaturas de los frigoríficos domésticos entre el día y la noche que hace que aumente más el riesgo de crecimiento de la bacteria (Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M. Zurero G., 2007).

El **REGLAMENTO (CE) 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 28 de enero de 2002** por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria establece en su artículo 14 los requisitos de seguridad alimentaria en el que se indica que el fabricante debe comercializar un producto alimenticio seguro, para ello tiene que tener en cuenta las condiciones normales de uso del alimento por los consumidores y en cada fase de la producción, la transformación y la distribución y la información ofrecida al consumidor mediante la etiqueta.

---

14

Asimismo en el **REGLAMENTO (CE) 2073/2005** se responsabiliza al explotador de la empresa alimentaria de categorizar el producto y de garantizar y documentar el cumplimiento de los criterios de higiene y de los criterios de seguridad alimentaria de los productos comercializados a lo largo de toda la vida útil.

En ello se establecen tres categorías de productos (tabla 6):

- Categoría 1.1 ALC destinados a lactantes y ALC destinados a usos médicos especiales
- Categoría 1.2 ALC que puedan favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales
- Categoría 1.3 ALC que no puedan favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales

| Categorías de alimentos                                                                                                                                         | Plan de muestreo (1) |   | Límites (2)          |   | Método analítico de referencia (3) | Fase en la que se aplica el criterio                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---|----------------------|---|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                 | n                    | c | m                    | M |                                    |                                                                                                                        |
| 1.1. ALC destinados a los lactantes, y ALC destinados a usos médicos especiales (4)                                                                             | 10                   | 0 | Ausencia en 25 g     |   | EN/ISO 11290-1                     | Productos comercializados durante su vida útil                                                                         |
| 1.2. ALC que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales             | 5                    | 0 | 100 ufc/g (5)        |   | EN/ISO 11290-2 (6)                 | Productos comercializados durante su vida útil                                                                         |
|                                                                                                                                                                 |                      |   | Ausencia en 25 g (7) |   | EN/ISO 11290-1                     | Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido |
| 1.3. ALC que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4). (8) | 5                    | 0 | 100 ufc/g            |   | EN/ISO 11290-2 (6)                 | Productos comercializados durante su vida útil                                                                         |

**Tabla 6. Criterios de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*. Anexo I Reglamento (CE) 2073/2005**

Es importante indicar que la seguridad alimentaria hay que gestionarla mediante la vigilancia de los PCCs (Puntos de Control Críticos) fijados en el APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) del sistema de autocontrol de la empresa como es la vigilancia de los factores intrínsecos del producto como  $a_w$  y pH. También el control inicial de contaminación de materias primas, como las contaminaciones cruzadas dentro de la industria es fundamental para controlar que no se exceda de las 100 UFC/g durante toda la vida útil. Si es posible la superación de este nivel se debe revisar estos controles, reducir el potencial de crecimiento de *Listeria* ajustando los factores intrínsecos del producto final, reformulando el producto o realizando tratamiento adicionales (Iñigo Nuñez S., Jimenez Manso A., 2012).

De acuerdo con la nota 8 del Anexo I del Reglamento (CE) 2073/2005, son productos considerados que no favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* los que cumplen las siguientes características:

- Productos con  $pH < 4.4$  ó  $a_w < 0.92$
- Productos con  $pH < 5.0$  y  $a_w < 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Otros productos científicamente justificados, como los productos congelados.

Otra opción que tiene el operador económico de clasificar el producto como favorable o no del crecimiento de *L. monocytogenes* es con lo que (EURL Lm, 2014) denomina como potencial de crecimiento (d) y se define como la diferencia entre la concentración encontrada al final y al principio de la vida útil en Log CFU/g. Así si  $d > 0.5$  Log CFU/g se clasifica como categoría 1.2 mientras si  $d \leq 0.5$  Log CFU/g sería categoría 1.3.

En este mismo Reglamento se establecen los estudios para investigar el cumplimiento de los criterios microbiológicos a lo largo de toda la vida útil (Anexo II, Artículo 3 apartado 2) de un producto, cuando sea necesario y sobre todo cuando sea favorecedor de crecimiento de esta bacteria y pueda suponer un riesgo para la salud pública. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el anexo II no describe el procedimiento técnico para realizar los estudios de vida útil.

Para ello debe caracterizar el producto por el empresario y considerará lo siguiente:

- *“especificaciones de las características fisicoquímicas del producto, como pH, aw, contenido de sal, concentración de conservantes y tipo de sistema de envasado, teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento y transformación, las posibilidades de contaminación y la vida útil prevista”*
- *“la consulta de la bibliografía científica y de los datos de investigación disponibles acerca de los aspectos que caracterizan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en cuestión”*

---

16

Cuando se desconozca si puede haber crecimiento en base a justificaciones científicas, según esta normativa, la empresa deber realizar estudios complementarios para asegurar el cumplimiento de la normativa durante toda su vida útil, usando el histórico de datos, microbiología predictiva, estudios de durabilidad o ensayos de desafío (Iñigo Nuñez S., Jimenez Manso A., 2012). Los estudios de durabilidad y ensayos de desafío (Challenge test) se realizan mediante pruebas de laboratorio específicas.

Los controles sanitarios oficiales tendrán que verificar que el histórico de datos de la empresa es suficiente para demostrar que ALC tienen  $< 100$  UFC/g durante la vida útil de producto. Se puede requerir que se complementen con otros estudios complementarios preceptivos, si fuesen necesario, y sobre todo estableciéndose que cuantas más unidades se hayan analizado más fiabilidad aportará el histórico de datos recogidos por la empresa.

Con éste histórico, se va a definir una situación de partida de la empresa en cuanto:

5. Al nivel de *L. monocytogenes* en el ambiente de producción, materias primas y ALC existentes bajo la aplicación del sistema de autocontrol de la empresa (PGH+APPCC).
6. Al potencial de crecimiento en ALC similares
7. A confirmar que la vida útil establecida es apropiada cuando se almacena, manipula y se utiliza de forma razonable.

En caso de que no hubiese suficiente información de todos los factores, éstos pueden ser sustituidos con el conocimiento de productos comparables (Zwietering, M.H, Wijtzes T., Rombouts F.M, van 't Riet K., 1993).

El estudio complementario basado en la microbiología predictiva, son estudios basados en modelos matemáticos de pronóstico que predicen o simulan el comportamiento del microorganismo en un alimento.

Son modelos predictivos para cuando se conocen las características físico-químicas del alimento y la temperatura de conservación o bien predecir el comportamiento de microorganismos en alimentos particulares, cualesquiera que sean sus condiciones de conservación (Wijtzes T., McClure P.J, Zwietering M.H., Roberts T.A., 1993), (Garre Pérez A., Egea Larrosa J.A., Fernández Escámez P.S, 2016).

---

17

Así tenemos distintos modelos:

- **Primarios:** La función matemática que se genera con parámetros cinéticos en función de la concentración de microorganismos (activación, inactivación, crecimiento, muerte) frente al tiempo transcurrido. (Garre Pérez A., Egea Larrosa J.A., Fernández Escámez P.S, 2016) establecen en su artículo científico que los modelos más usados en la literatura científica son el de Zwietering *et al* (1990), Baranyi y Roberts (1994), Buchanan *et al* (1997) y McKellar (2001).
- **Secundarios:** La función matemática es construida relacionando los parámetros de la función primaria con parámetros cinéticos en función de las condiciones ambientales (pH,  $a_w$ , concentración de oxígeno, etc).
- **Terciarios:** Se integran los modelos primarios y secundarios en herramientas software que traducen los datos que emanan de ellos a evaluación de calidad, de I+D, etc.

La microbiología predictiva es muy utilizada en seguridad alimentaria para predecir el crecimiento bacteriano en distintas condiciones, la probabilidad de crecimiento del microorganismo en el alimento, estimar el nivel de contaminación en un día dado de la vida útil, probar la variabilidad entre dos lotes, optimizar la formulación (aditivos, pH, sal) para garantizar una mejor estabilidad, evaluar el impacto de las roturas de cadena de frío y probar diferentes escenarios de conservación y ayudar a identificar PCC de un proceso.

El grado de crecimiento exponencial (EGR, 1/h) que son obtenidos de los estudios de laboratorio suelen proceder de condiciones de crecimiento mejores que los dados en el producto real (Pérez-Rodríguez F., Carrasco E., Bover-Cid S., Jofré A., Valero A., 2017). Por lo que en los modelos de crecimiento predictivo de *L. monocytogenes* se produce los niveles esperados de concentración en menor cantidad de tiempo, con lo que sería un escenario más conservador.

Existen numerosas aplicaciones desarrolladas para ser usadas en microbiología predictiva, el Instituto Federal Alemán para el análisis de Riesgos (BfR) proporciona en su página web un listado de las aplicaciones contrastadas disponibles. <https://foodrisklabs.bfr.bund.de/microbialmodeling-exchange-wiki/>. (Rubio Gonzalez A., 2019).

---

18

Son bases de datos que contienen información de cómo los microorganismos responden a diferentes entornos medioambientales. Proporciona una cuantificación microbiana, describiendo cómo los niveles de microorganismos, tanto alterantes como patógenos, cambian a lo largo del tiempo. Este tipo de información se refiere a parámetros cinéticos.

Entre ellas, las que se ha empleado para realizar este trabajo son:

COMBASE PREDICTOR. Es una aplicación desarrollada por The United Kingdom Institute of Food Research (IFR), The United States Agricultural Research Service (USDA-ARS) y The Australian Food Safety Centre of Excellence (AFSCoE). En ella se recopila datos de identificación de microorganismos, tipos de alimentos, nivel de acidez, temperatura, actividad agua o concentración NaCl y la presencia de condiciones específicas, como aditivos, métodos de preparación y envasado. El navegador de Combase permite buscar miles de curvas de crecimiento y supervivencia microbiana que han sido recogidos en centro de investigación y publicaciones. Los modelos predictivos de Combase son una colección de herramientas de software basados en los datos de Combase para predecir el

crecimiento o inactivación de los microorganismos.  
<https://www.combase.cc/index.php/es/>.

MICROHIBRO. Es una herramienta desarrollada por el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba. Presenta un módulo de predicción que está basado en modelos matemáticos contenidos en una base de datos (Predictive Model Data Base PMDB). Las predicciones pueden ser obtenidas en diferentes matrices alimentarias y en caldo para diversos microorganismos.  
<https://www.microhibro.com/tools>.

DANISH MEAT RESEARCH INSTITUTE PREDICTIVE MODELS FOR MEAT (DMRI-PREDICT). Es una herramienta elaborada por The Danish Directorate for Food, Fisheries and Agri-Business, the Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, the Pig Levy Fund, the Cattle Levy Fund, the Poultry Levy Fund, the Danish Agency for Science, Technology and Innovation, the Ministry of Science y un número de empresas cárnicas y organizaciones. Predice el crecimiento de *L. monocytogenes* en relación a siete variables (temperatura, NaCl, pH, L-lactato, acetato, nitrito y CO<sub>2</sub>) en el producto cárnico.  
<http://dmripredict.dk/>

## 2.- Objetivos

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster es comparar el uso de varias herramientas de microbiología predictiva para estimar la vida útil de productos cárnicos crudos-curados y cocidos listos para ser consumidos en relación al crecimiento o inactivación de *Listeria monocytogenes*.

La intención de este estudio es ver la utilidad de la microbiología predictiva para el operador económico como ayuda para calcular la vida útil de un producto cárnico y para el control oficial encargado de vigilar estas industrias que tienen que hacer una verificación de la vida útil de estos productos listos para comercializarse.

### 3.- Material y métodos:

Para el desarrollo de este trabajo se han usado dos productos cárnicos crudo-curado y un producto cárnico cocido elaborados en una industria cárnica de mediana capacidad en la provincia de Jaén. Los productos escogidos son: Chorizo formato vela, Salami y Jamón cocido Extra.

Se ha realizado la siguiente metodología:

- Para el Chorizo formato vela una simulación de crecimiento de *Listeria monocytogenes* con la aplicación de microbiología predictiva MICROHIBRO®. Se realiza comprobación de la variabilidad de los lotes aportados por el fabricante.
- Para el Salami una simulación de inactivación de *Listeria monocytogenes* con la aplicación de microbiología predictiva COMBASE PREDICTOR.
- Para el Jamón cocido una simulación de crecimiento de *Listeria monocytogenes* con la aplicación de microbiología predictiva DMRI-PREDICT.

Se han elegido las distintas herramientas en función de las características físico-químicas de los productos y los modelos validados en cada aplicación.

20

#### a) Determinación de las características físico-químicas de los productos

La determinación de las características físico-químicas son los datos recogidos por la propia empresa para cada producto.

En el caso del Chorizo los datos aportados son de diferentes lotes recogidos desde el año 2012 al 2020 (n=27). Para el Salami y Jamón cocido Extra son medias aportadas por el fabricante.

| PRODUCTO             | Diametro pieza | MERMA ( % aproximado) | Contenido en sal (% en fresco) | Contenido en sal (% en producto mermado) | Nitrato sódico añadido(ppm) | Nitrito Sódico añadido (ppm) | Conservante adicional (en caso de emplearse) | Aw media final | pH medio final | Tipo de envasado | Fecha consumo preferente envase | Temperatura conservación etiquetado |
|----------------------|----------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|----------------|----------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| CHORIZO FORMATO VELA | 80 mm          | 27                    | 2                              | 2,8                                      | 130                         | 130                          | CULTIVOS ACIDO-LACTICOS                      | 0,83           | 4,95           |                  | 6 meses                         | <12°C.<br>Si está al vacío 0-8°C    |

Tabla 7. Caracterización del chorizo formato vela

| PRODUCTO | Diametro pieza | MERMA ( % aproximado) | Contenido en sal (% en fresco) | Contenido en sal (% en producto mermado) | Nitrato sódico añadido(ppm) | Nitrito Sódico añadido (ppm) | Conservante adicional (en caso de emplearse) | Aw media final | pH medio final | Tipo de envasado |
|----------|----------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|----------------|----------------|------------------|
| SALAMI   | 90 mm          | 23                    | 1,2                            | 1,6                                      | 105                         | 140                          |                                              | 0,86           | 4,8            | VACÍO            |

Tabla 8. Caracterización del Salami

| JAMÓN COCIDO EXTRA |         |
|--------------------|---------|
| Aw                 | 0,97    |
| pH                 | 6,58    |
| NaCl               | 1,95%   |
| Lactato            | 1,40%   |
| Nitritos           | 120 ppm |
| Humedad            | 74,35%  |
| Envasado           | vacío   |

Tabla 9. Caracterización del Jamón cocido Extra

*b) Bibliografía científica*

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en bases de datos y otros recursos. Se consideró dos tipos de información: i) Procedente de bases de datos científicas como MEDLINE, Google Scholar, ScienceDirect y ii) Procedente de buscadores de las bases de datos de las aplicaciones de microbiología predictiva (ejemplo COMBASE PREDICTOR).

*c) Históricos de datos*

La empresa realiza de manera regular análisis de superficie y de materias primas como control medioambiental de la industria, así como de la calidad microbiológica de las materias primas. No teniendo reflejado en su sistema de autocontrol ningún positivo a *Listeria monocytogenes* hasta la fecha.

Se realizan análisis de productos intermedios y de productos acabados listos para su comercialización como verificación del sistema de autocontrol implantado en la empresa y cumplimiento de la legalidad vigente y para poder garantizar un producto apto y seguro para su consumo. Tampoco tiene datos positivos a *Listeria* en producto terminado.

d) *Variabilidad de las muestras. RED BIOQURA*

La RED BIOQURA es una herramienta estadística que permite evaluar la consistencia del histórico de resultados analíticos. Está disponible en internet (<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>) y permite calcular el límite superior del intervalo de confianza, considerando un nivel de confianza determinado que generalmente suele oscilar entre el 95- 99%. De este modo, introduciendo el número de muestras positivas respecto a la totalidad de muestras analizadas, la herramienta calcula de forma sencilla el intervalo de confianza de dichos datos. En la toma de decisiones sobre la fiabilidad del histórico de datos se recomienda que el límite superior del intervalo de confianza sea igual o inferior a 0,05, asumiendo un nivel de confianza del 95%. En estos casos el histórico de datos podrá ser suficiente por sí mismo para establecer la vida útil de forma segura.

e) *Cálculo del nivel de percentil*

El percentil es un valor usado en estadística que nos divide un conjunto de datos ordenados. Con los datos aportados por la empresa calculamos el nivel 95% de percentil para la  $a_w$  y pH, con lo que adoptamos una postura conservadora a la hora de hacer el estudio ya que a niveles mayores la bacteria crece mejor.

22

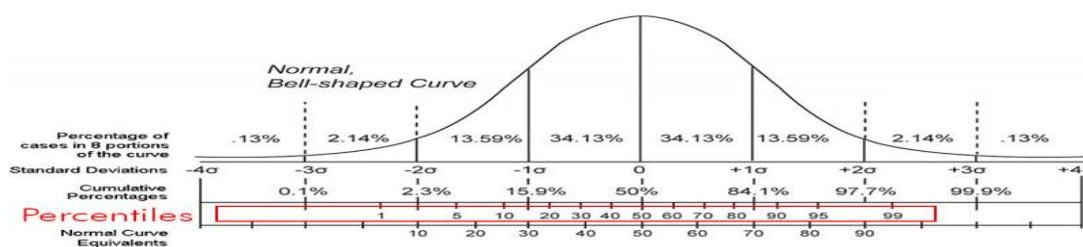


Figura 3. Determinación de percentiles en una distribución normal

f) *Aplicación de modelos matemáticos con microbiología predictiva*

Los datos necesarios para cada aplicación informática que permita calcular el crecimiento o inactivación microbiana son los siguientes:

COMBASE PREDICTOR

- Modelo: Estático
- Microorganismo: *Listeria monocytogenes/innocua*
- N° inicial: 0 log UFC/g , 1 log UFC/g
- Condiciones de almacenamiento más desfavorable de pH y Temperatura
- Concentración de NaCl

- o Estado fisiológico de las células: El prefijado por COMBASE para este microorganismo:  $2 \times 10^{-2}$

## MICROHIBRO

**Seman et al. (2002)**

**CONDICIONES DE PREDICCIÓN**

|                        |       |                    |
|------------------------|-------|--------------------|
| y0<br>(log10(count))   | 0.00  | Rango: [-10,20]    |
| lag<br>(h)             | 0.0   | Rango: [0,10000]   |
| m<br>(Dimensionless)   | 0.00  | Rango: [0,10]      |
| ymax<br>(log10(count)) | 9.0   | Rango: [-10,20]    |
| NaCL<br>(%)            | 0.80  | Rango: [0.8,3.6]   |
| DiacetateNa<br>(%)     | 0.00  | Rango: [0,0.2]     |
| LactateK<br>(%)        | 0.25  | Rango: [0.25,9.25] |
| moisture<br>(%)        | 45.50 | Rango: [45.5,83.5] |

**NIVEL DE INTERÉS / UMBRALES**

|                                  |   |                                          |
|----------------------------------|---|------------------------------------------|
| N <sub>t</sub><br>(log10(count)) | 2 | Rango: [N <sub>0</sub> ,N <sub>t</sub> ] |
|----------------------------------|---|------------------------------------------|

Figura 4. Condiciones de Predicción basado en Seman et al. (2002) para MicroHibro

## DANISH MEAT RESEARCH INSTITUTE PREDICTIVE MODELS FOR MEAT (DMRI-PREDICT)

Static Version 2.0 (October 2014)

23

### Recipe variables

☐ Multiple

|                        |      |     |                       |
|------------------------|------|-----|-----------------------|
| Na-lactate in recipe   | 0.0  | %   | <input type="radio"/> |
| Na-acetate in recipe   | 0.00 | %   | <input type="radio"/> |
| Na-nitrite in recipe   | 0    | ppm | <input type="radio"/> |
| pH in final product    | 0    | *   | <input type="radio"/> |
| NaCl in final product  | 0    | % * | <input type="radio"/> |
| Water in final product | 0    | % * | <input type="radio"/> |

Product type

- ☒ Whole muscle product ( $\leq 10\%$  fat)
- ☐ Emulsified product ( $> 10\%$  fat)

### Storage variables

|                                             |   |      |                       |
|---------------------------------------------|---|------|-----------------------|
| Added CO <sub>2</sub>                       | 0 | %    | <input type="radio"/> |
| Temperature                                 | 0 | °C * | <input type="radio"/> |
| L. monocytogenes count at time zero (cfu/g) | 1 |      |                       |

Figura 5. Variables necesarias para hacer la predicción de crecimiento con DMRI.

### 3.- Resultados y discusión:

#### a) CHORIZO FORMATO VELA

##### Características físico-químicas de los productos cárnicos

Con respecto a los valores medios físicos-químicos aportados por el fabricante, en el caso del CHORIZO VELA encontramos que el pH presenta un valor de  $4,94 \pm 0,11$ , acorde con lo encontrado en la literatura científica (Menéndez R.A, Rendueles E., Sanz J.J., Santos J.A., García-Fernandez C., 2018) para este tipo de producto. Estos valores se encuentran dentro del rango de baja acidez propios de los productos cárnicos fermentados en España. Con respecto a la  $a_w$  el valor obtenido es bajo ( $0,84 \pm 0,02$ ), lo cual está también dentro de los valores de este tipo de productos (Ruiz-Ramirez J., Serra X., Arnau J., Gou P., 2005) (Casquete R., Benito M., Martín A., Ruiz-Moyano S., Aranda E., Córdoba M. G., 2012), (Hew C.M., Hajmeer M.N., Farver T.B., Glover J.M., Cliver D.O., 2005).

Otro factor es el contenido en sal (NaCl), el dato aportado fue del 2,08% en producto mermado y del 2 % en producto fresco dato en concordancia con el artículo (Menéndez R.A, Rendueles E., Sanz J.J., Santos J.A., García-Fernandez C., 2018) para este tipo de productos.

Con respecto a los agentes conservantes, al producto se le añadió 130 ppm de nitrato sódico y 130 ppm de nitrito sódico.

##### Variabilidad de las muestras: RED BIOQURA

En la tabla 11 se recogen los datos globales aportados por la empresa cárnica para un total de 27 muestras.

Aplicando la herramienta “RED BIOQURA” obtenemos que:

Con respecto a la  $a_w$  la proporción del nivel superior al máximo admisible (0,92), de acuerdo con la nota 8 del Anexo I del Reglamento (CE) 2073/2005, es del 0%.

| Resumen de las observaciones                                       | Resultados del cálculo                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>aw media:</b><br><input type="text" value="0.8"/>               | <b>Proporcion de muestras con un aw superior al admisible</b><br>Se estima un porcentaje del 0 %<br><hr/> Eso es, 0 unidades de cada 1000. |
| <b>Desv. standard del aw:</b><br><input type="text" value="0,02"/> |                                                                                                                                            |
| <b>Número de medidas:</b><br><input type="text" value="27"/>       |                                                                                                                                            |
| <b>aw máximo admisible</b><br><input type="text" value="0,92"/>    |                                                                                                                                            |

Y con respecto al pH es el 100% de las muestras con un valor superior al admisible.



Por lo que según Anexo I del Reglamento (CE) 2073/2005, es un ALC no favorecedor de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

### Cálculo del nivel percentil

Según los cálculos realizados en EXCEL con los datos aportados por la empresa para un percentil de 95%, la  $a_w$  es de 0,90 y para el pH 5,0. (Tabla 11). Con estos resultados y en virtud de la nota 8 del Anexo I del Reglamento (CE) 2073/2005 este producto no es favorecedor de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

**Microbiología predictiva**

La simulación de crecimiento bajo unas condiciones definidas se ha realizado con la aplicación informática de microbiología predictiva MicroHibro®.

En base al producto estudiado (producto cárnico crudo curado) se ha aplicado del “Buscador de modelos mediante árbol de alimentos” de la aplicación informática (Figura 6) el modelo Seman *et al.* 2002 (Metadatos tabla 13) ya que es el que mejor se ajustaba en base a los parámetros cinéticos aportados por el empresario. En este estudio se usa el modelo Baranyi&Roberts (1994) como función primaria y Seman *et al.* 2002 como función secundaria  $\mu_{max}$  (Figura 7).

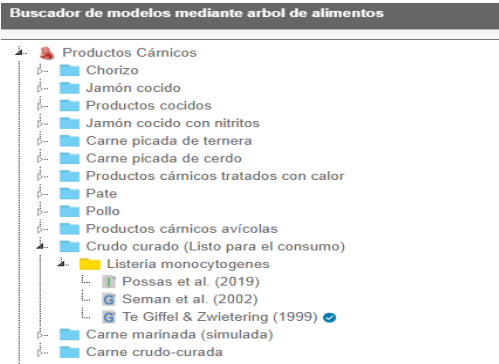


Figura 6. Buscador de modelos mediante árbol de alimentos (MicroHibro©)

| #   | Alimento/ Variable-Respuesta                                   | Primaria/Secundaria o Terciaria                                                                      | Parámetros        |                      |       |                    |                  |            |  |
|-----|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|-------|--------------------|------------------|------------|--|
| 105 | Crudo curado (Listo para el consumo)<br>Listeria monocytogenes | Baranyi & Roberts (1994)_log10(mu)<br>Seman et al. (2002); Listeria monocytogenes; Ready-to-eat meat | y0                | umax                 | lag   | m                  | ymax             | t          |  |
|     |                                                                |                                                                                                      | 0.00 log10(count) | 0.001 log10(count/h) | 0.0 h | 1.00 Dimensionless | 9.0 log10(count) | 3607.204 h |  |
| 185 | Crudo curado (Listo para el consumo)<br>Listeria monocytogenes | Baranyi & Roberts (1994)_log10(mu)<br>Seman et al. (2002); Listeria monocytogenes; Ready-to-eat meat | y0                | umax                 | lag   | m                  | ymax             | t          |  |
|     |                                                                |                                                                                                      | 1.00 log10(count) | 0.000 log10(count/h) | 0.0 h | 1.00 Dimensionless | 9.0 log10(count) | 2253.166 h |  |

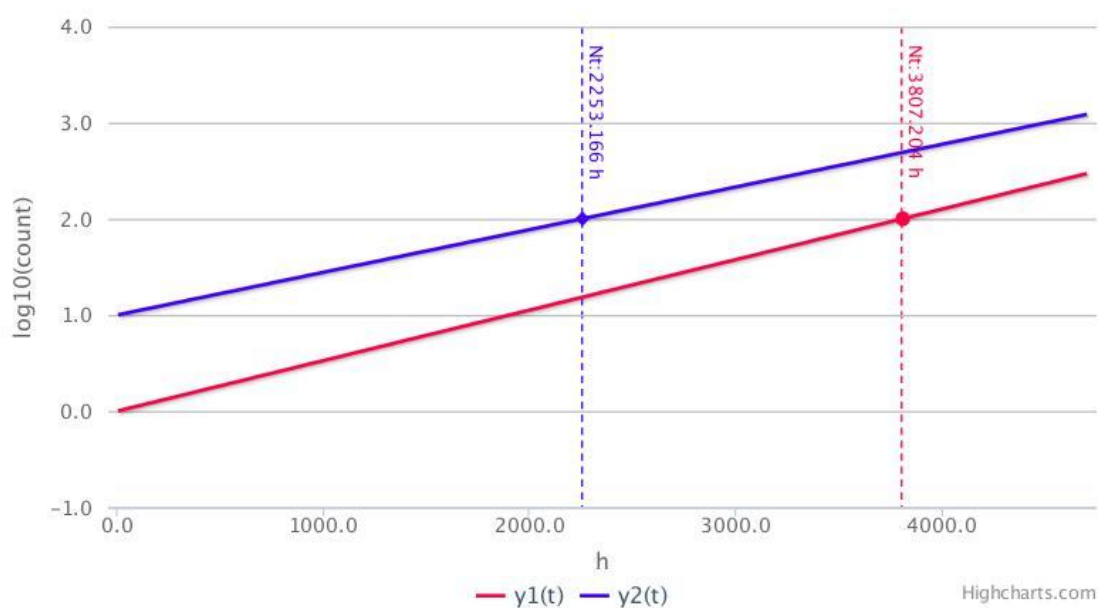
Figura 7. Modelos microbianos para alimento crudo-curado y parámetros cinéticos (MicroHibro©)

Las condiciones de predicción estimadas para las ecuaciones matemáticas que el programa realiza son los representados en la Tabla 10.

| Condiciones de predicción |       |                                      |
|---------------------------|-------|--------------------------------------|
| Y <sub>0</sub> (Log 10)   | NaCl% | Nivel de interés/Umbrales (Nt) log10 |
| 0                         | 2,8   | 2                                    |
| 1                         | 2,8   | 2                                    |

Tabla 10. Condiciones de predicción para el chorizo vela

Se obtuvo la siguiente gráfica que representa el modelo microbiano para cada una de las concentraciones iniciales (0 y 1 log10).



Gráfica 1. Modelo de crecimiento de *Listeria monocytogenes* a concentraciones iniciales 0 y 1 log10 en producto cárnico curado (MicroHibro)

Según los cálculos representados en la Gráfica 1 para una concentración inicial de 0 log 10 UFC/g el tiempo que tardaría en alcanzar el límite legal de 2log10 (100ufc/g) sería de 3807,204h (158días/5,28 meses) y para una concentración inicial de 1log10 UFC/g sería 2253.166h (93,88 días/3,12 meses). Los datos calculados para la estimación de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en este producto cárnico se recogen en la tabla 12.

El fabricante había establecido una vida media de 6 meses, aunque según el modelo predictivo el nivel máximo permitido de 100 UFC/g lo alcanzaría a los 5,28 meses con lo que sería recomendable reducir el tiempo de vida útil estimada para mayor seguridad, aunque habría que ir comparándolo con datos analíticos de productos al final de la vida útil.

El estudio con una concentración inicial de  $1 \log_{10}$  UFC/g, es recomendable puesto que si esa contaminación se produjera es por una alta probabilidad de que la materia prima lo aporte encontrándose, tal como se reporta en varios estudios, *Listeria* spp al inicio del proceso de fabricación. (Casquete R., Benito M., Martín A., Ruiz-Moyano S., Aranda E., Córdoba M. G., 2012). O bien aportado en la manipulación en el punto de venta por las máquinas del loncheado. (Silva R., Pereira., Rouxinol M., Patarata L., 2020).

Los nitritos y nitratos que se añaden en la producción de los productos cárnicos son una barrera que impiden el crecimiento de este patógeno. En la Unión Europea está regulado por la **Directiva Europea 2006/52/EC (Parlamento Europeo, 2006)** que fija unos límites de 150 ppm para cada producto siendo cada vez más restrictivo en el uso de estos conservantes. Por ello el uso de esta herramienta servirá para predecir el comportamiento de este microorganismo con valores más bajos de estos conservantes en relación a otras variables que comportan las características intrínsecas de estos productos que deberán tenerse en cuenta a la hora de controlar este patógeno en el embutido (Hospital X.F, Hierro E., Fernández M, 2012).

En el modelo usado en esta aplicación no emplea la variable temperatura para predecir el crecimiento, en cambio (Hew C.M., Hajmeer M.N., farver T.B., Glover J.M., Cliver D.O., 2005) establecieron en su estudio que la temperatura y el tiempo de almacenaje son influyentes en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en el chorizo. Encontraron que la bacteria era más susceptible a los efectos bactericidas de un pH ácido en chorizo almacenados a temperatura alta que los almacenados a refrigeración o a temperatura ambiente. En cambio en otros estudios se señala que la velocidad de crecimiento se ve afectada por las condiciones del medio y la disponibilidad de sustrato, más que por los rangos de temperatura de interés (Tirado J., Paredes D., Velazquez., Torres J.A., 2005).

| CHORIZO VELA |       |               |                  |
|--------------|-------|---------------|------------------|
| Aw           | pH    |               |                  |
| 0,926        | 4,74  | PROMEDIO Aw   | DESV STAND       |
| 0,906        | 5,08  | 0,847462963   | 0,027021689      |
| 0,850        | 4,8   | PROMEDIO PH   | DESV STAND       |
| 0,874        | 5,09  | 4,955961538   | 0,104307423      |
| 0,866        | 4,995 |               |                  |
| 0,891        | 5     | Percentil 95% |                  |
| 0,879        | 4,89  | Aw            | Percentil 95% pH |
| 0,859        | 4,94  | 0,9015        | 5,087            |
| 0,844        | 5,09  |               |                  |
| 0,8375       | 5,03  |               |                  |
| 0,823        | 5     |               |                  |
| 0,832        | 4,98  |               |                  |
| 0,821        | 4,97  |               |                  |
| 0,819        | 4,92  |               |                  |
| 0,821        | 4,98  |               |                  |
| 0,831        | 4,82  |               |                  |
| 0,831        | 5,01  |               |                  |
| 0,846        | 4,99  |               |                  |
| 0,826        | 4,98  |               |                  |
| 0,843        | 5,03  |               |                  |
| 0,848        | 5,02  |               |                  |
| 0,827        | 4,98  |               |                  |
| 0,837        | 4,7   |               |                  |
| 0,841        | 4,68  |               |                  |
| 0,83         | 4,92  |               |                  |
| 0,839        | 4,96  |               |                  |
| 0,834        | 5     |               |                  |

Tabla 11. Datos aportados por la empresa de distintos lotes de fabricación de chorizo vela

| #  | T       | Listeria monocytogenes | Listeria monocytogenes |
|----|---------|------------------------|------------------------|
|    | H       | log10(count)           | log10(count)           |
| 0  | 0.00    | 0.000                  | 1.000                  |
| 1  | 82.86   | 0.044                  | 1.037                  |
| 2  | 165.71  | 0.087                  | 1.074                  |
| 3  | 248.57  | 0.131                  | 1.110                  |
| 4  | 331.43  | 0.174                  | 1.147                  |
| 5  | 414.29  | 0.218                  | 1.184                  |
| 6  | 497.14  | 0.261                  | 1.221                  |
| 7  | 580.00  | 0.305                  | 1.257                  |
| 8  | 662.86  | 0.348                  | 1.294                  |
| 9  | 745.71  | 0.392                  | 1.331                  |
| 10 | 828.57  | 0.435                  | 1.368                  |
| 11 | 911.43  | 0.479                  | 1.405                  |
| 12 | 994.29  | 0.522                  | 1.441                  |
| 13 | 1077.14 | 0.566                  | 1.478                  |
| 14 | 1160.00 | 0.609                  | 1.515                  |
| 15 | 1242.86 | 0.653                  | 1.552                  |
| 16 | 1325.71 | 0.696                  | 1.588                  |
| 17 | 1408.57 | 0.740                  | 1.625                  |
| 18 | 1491.43 | 0.783                  | 1.662                  |
| 19 | 1574.29 | 0.827                  | 1.699                  |
| 20 | 1657.14 | 0.871                  | 1.735                  |
| 21 | 1740.00 | 0.914                  | 1.772                  |
| 22 | 1822.86 | 0.958                  | 1.809                  |
| 23 | 1905.71 | 1.001                  | 1.846                  |
| 24 | 1988.57 | 1.045                  | 1.883                  |
| 25 | 2071.43 | 1.088                  | 1.919                  |
| 26 | 2154.29 | 1.132                  | 1.956                  |
| 27 | 2237.14 | 1.175                  | 1.993                  |
| 28 | 2320.00 | 1.219                  | 2.030                  |
| 29 | 2402.86 | 1.262                  | 2.066                  |
| 30 | 2485.71 | 1.306                  | 2.103                  |
| 31 | 2568.57 | 1.349                  | 2.140                  |
| 32 | 2651.43 | 1.393                  | 2.177                  |
| 33 | 2734.29 | 1.436                  | 2.214                  |
| 34 | 2817.14 | 1.480                  | 2.250                  |
| 35 | 2900.00 | 1.523                  | 2.287                  |

|    |         |       |       |
|----|---------|-------|-------|
| 36 | 2982.86 | 1.567 | 2.324 |
| 37 | 3065.71 | 1.610 | 2.361 |
| 38 | 3148.57 | 1.654 | 2.397 |
| 39 | 3231.43 | 1.698 | 2.434 |
| 40 | 3314.29 | 1.741 | 2.471 |
| 41 | 3397.14 | 1.785 | 2.508 |
| 42 | 3480.00 | 1.828 | 2.544 |
| 43 | 3562.86 | 1.872 | 2.581 |
| 44 | 3645.71 | 1.915 | 2.618 |
| 45 | 3728.57 | 1.959 | 2.655 |
| 46 | 3811.43 | 2.002 | 2.692 |
| 47 | 3894.29 | 2.046 | 2.728 |
| 48 | 3977.14 | 2.089 | 2.765 |
| 49 | 4060.00 | 2.133 | 2.802 |
| 50 | 4142.86 | 2.176 | 2.839 |
| 51 | 4225.71 | 2.220 | 2.875 |
| 52 | 4308.57 | 2.263 | 2.912 |
| 53 | 4391.43 | 2.307 | 2.949 |
| 54 | 4474.29 | 2.350 | 2.986 |
| 55 | 4557.14 | 2.394 | 3.023 |
| 56 | 4640.00 | 2.437 | 3.059 |
| 57 | 4722.86 | 2.481 | 3.096 |
| 58 | 4805.71 | 2.525 | 3.133 |
| 59 | 4888.57 | 2.568 | 3.170 |
| 60 | 4971.43 | 2.612 | 3.206 |
| 61 | 5054.29 | 2.655 | 3.243 |
| 62 | 5137.14 | 2.699 | 3.280 |
| 63 | 5220.00 | 2.742 | 3.317 |
| 64 | 5302.86 | 2.786 | 3.354 |
| 65 | 5385.71 | 2.829 | 3.390 |
| 66 | 5468.57 | 2.873 | 3.427 |
| 67 | 5551.43 | 2.916 | 3.464 |
| 68 | 5634.29 | 2.960 | 3.501 |
| 69 | 5717.14 | 3.003 | 3.537 |
| 70 | 5800.00 | 3.047 | 3.574 |

**Tabla 12. Estimación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en relación al tiempo de fabricación del chorizo formato vela**

## METADATOS

- **Id:** 185
- **Nombre:** Seman et al. (2002)
- **Descripción:** Growth model proposed for *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat meat varying the NaCl (0.8 to 3.6%), sodium diacetate (0 to 0.2%), potassium lactate (0.25 to 9.25%) and product moisture (45.5 to 83.5%) content. In this case we use the Baranyi model as a primary function temporarily. In fact, the primary function of this secondary function is the linear model.
- **Microorganismo:** *Listeria monocytogenes*
- **Propiedades:** Patógeno
- **Alimentos:**
  - Crudo curado (Listo para el consumo): R2 = 0.76, BIC = 1.24, AIC = 1.97
- **Referencias:**
- **Función Primaria:**
  - **Nombre:** Baranyi & Roberts (1994)\_log10(mu)
  - **Ecuación:**  $+y_0 + (u_{max} * (t - lag + (\ln(1 - \exp(-u_{max} * \ln(10) * t) + \exp(-u_{max} * \ln(10) * (t - lag))) / (u_{max} * \ln(10)))) - (1 / (m * \ln(10))) * \ln(1 + ((\exp(m * u_{max} * \ln(10) * (t - lag + (\ln(1 - \exp(-u_{max} * \ln(10) * t) + \exp(-u_{max} * \ln(10) * (t - lag))) / (u_{max} * \ln(10)))) - 1) / (\text{pow}(10, m * (y_{max} - y_0)))))$
  - **Coefficientes:**
  - **Referencias:**
    - A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. József Baranyi \*, Terry A. Roberts International Journal of Food Microbiology. 23, 277-294. (1994)
- **Función Secundaria umax:**
  - **Nombre:** Seman et al. (2002); *Listeria monocytogenes*; Ready-to-eat meat
  - **Ecuación:**  $((0.07979 + (-0.00595 * NaCl) + (-0.13692 * DiacetateNa) + (-0.03490 * LactateK) + (0.00074 * moisture) + (0.00286 * \text{pow}(LactateK, 2)))) / 168$
  - **Coefficientes:**
  - **Referencias:**
    - Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. Seman, D.L., Borger, A.C., Meyer, J.D., Hall, P.A., Milkowski, A.L. Journal of Food Protection. 4:651-658. (2002)

**Tabla 13. Metadatos: Función Primaria: Baranyi&Roberts (1994); Función Secundaria: Seman et al 2002**

## b) SALAMI

En relación a los datos físico-químicos analizados por la empresa que se recogen en la tabla 8 observamos que acorde con el **Reglamento (CE) 2073/2005 Anexo I**, se cataloga como categoría 1.3 “ALC que no puedan favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales”.

De acuerdo con esto, utilizamos la aplicación COMBASE PREDICTOR el modelo en caldo “Non-thermal survival” para ver como se comportaría la *Listeria monocytogenes* con los parámetros de  $a_w$  0,86 y pH 4,8 a las temperaturas de 5°C, 7°C y 12°C según valores recomendados para su estudio por la **EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (versión 3, modificada 21/2/2019)**.

Se obtuvo el siguiente resultado:

Como se indica en la tabla 14 se produce una predicción de disminución de la concentración bacteriana típica de este producto como lo expresado por (Tirloni E., Di Pietro V., Rizzi G., Pomilio F., Cattaneo P., Bernardi C., Stella S., 2019) en su artículo, constituido fundamentalmente por la bacterias ácido lácticas (BAL) proveniente del cultivo iniciador o starter que inicialmente proporcionan una alta carga microbiana en la masa del salami. Este producto tiene un bajo pH debido a una acidificación causada por el crecimiento de las BAL y las altas temperaturas durante la fase de secado.

Por otro lado, la fase de latencia (lag time) debido a los cambios graduales de temperatura que pudiera tener en la conservación del producto hace que se disminuya esta fase debido principalmente a que el microorganismo se adapta paulatinamente al medio.

33

| Temperaturas | INICIO DE LA VIDA ÚTIL |                  | FINAL DE LA VIDA ÚTIL |                  |
|--------------|------------------------|------------------|-----------------------|------------------|
|              | Max rate (log conc/h)  | lag time (horas) | Max rate (log conc/h) | lag time (horas) |
| 5°C          | -0,003                 | 636,97           | -0,006                | 318,48           |
| 7°C          | -0,004                 | 477,72           | -0,006                | 318,48           |
| 12°C         | -0,005                 | 382,18           | -0,01                 | 191,09           |

**Tabla 14. Niveles de reducción de concentración máxima y tiempo lag a temperaturas (5,7,12°C) al principio y al final de la vida útil**

En la tabla 14, se puede observar una disminución en (log conc/h) que es más rápida conforme aumenta la temperatura tanto al inicio de la vida útil como al final. Esto es

debido a la bajada de pH y de la  $a_w$  que hacen que no se produzca crecimiento del patógeno. La combinación de microorganismos presentes en la masa y las características físico-químicas del salami hacen que no se permita el crecimiento. El potencial de crecimiento (d) es  $< 0.5 \log 10 \text{ UFC/g}$  por lo que se clasificaría como categoría 1.3.

Son necesarios este tipo de análisis cuando se varíen la ficha técnica de fabricación del producto para ir proporcionando condiciones más desfavorables al crecimiento y ajustar la formulación para fabricar un producto seguro.

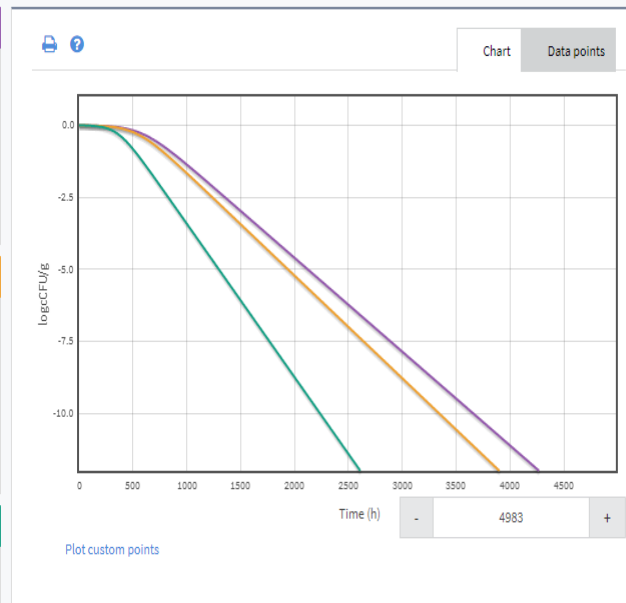
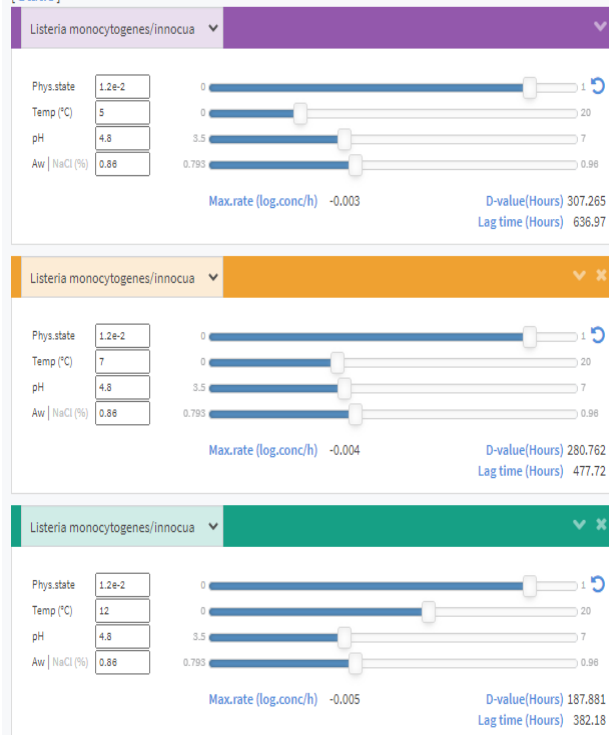
De hecho, la teoría de la naturaleza antilisteria de los embutidos crudos-curados como es el salami, puede ser cuestionado ya que como se evidencia en la literatura científica una recontaminación es posible durante la distribución o en el punto de venta y el riesgo va a depender del origen de la contaminación, temperatura de almacenaje y del tiempo entre la contaminación y el consumo del producto (Simpson C.A., Geornaras I., Yoon Y., Scanga J.A., Kendall P.A., Sofos J.N., 2008).

La aplicación DMRI PREDICT<sup>1</sup> también tiene un modelo de inactivación validado para lo cual requieren seis variables que son: Porcentaje de NaCl añadido a la mezcla, Nitritos añadidos en ppm, pH 48h, pH final, total peso perdido y la humedad contenida al final del producto (Gunvig A., Borggaard C., Hansen F., Hansen T.B., Aabo S., 2016). Al igual que MICROHIBRO que también presenta en su herramienta modelos microbiológicos de inactivación.

## Non Thermal Survival Model

Prediction Uncertainty

[Static]



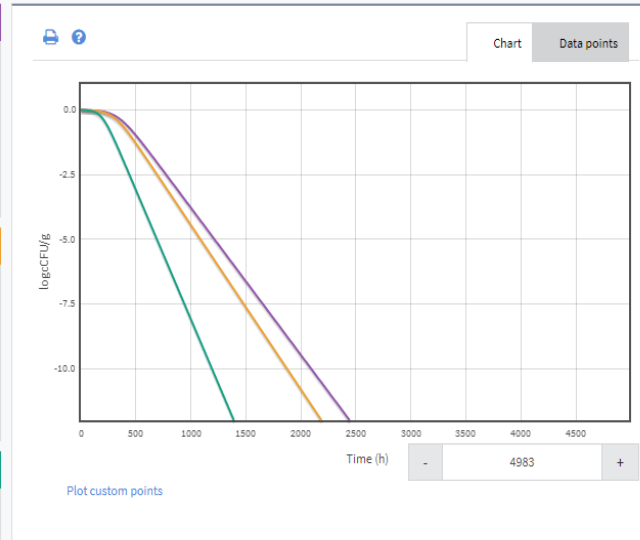
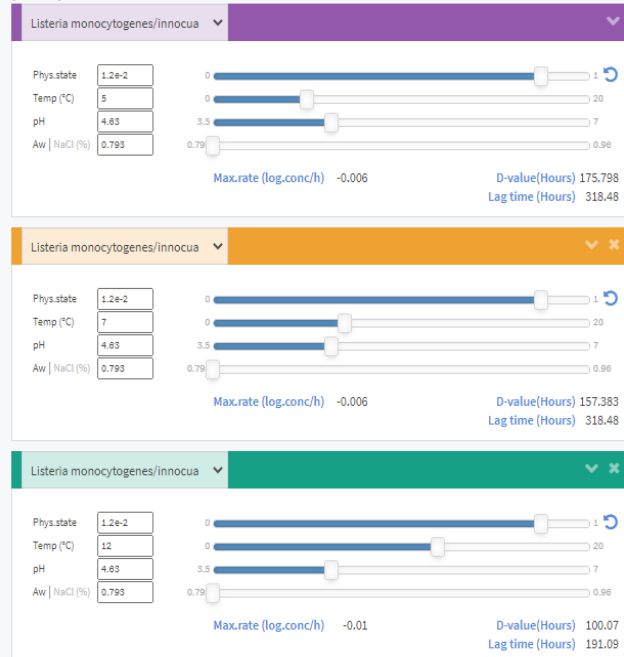
Gráfica 2. Inactivación de *Listeria monocytogenes/innocua* a temperaturas (5,7,12°C), pH 4,8 y Aw 0,86 al inicio de la vida útil

35

## Non Thermal Survival Model

Prediction Uncertainty

[Static]



Gráfica 3. Inactivación de *Listeria monocytogenes/innocua* a temperaturas (5,7,12°C), pH 4.63 y Aw 0.79 al final de la vida útil

### c) JAMÓN COCIDO EXTRA

De acuerdo con los datos físico-químicos del producto cárnico cocido expresado en la tabla 9, observamos que acorde con el **Reglamento (CE) 2073/2005 Anexo I**, se cataloga como categoría 1.2 “ALC que puedan favorecer el desarrollo de *L.monocytogenes* que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales”. Y encontramos que la norma presenta en función de la fase dos límites, si el producto es comercializado durante su vida útil ( $n=5$ ,  $c=0$ ) 100ufc/g y si el producto se encuentra antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido, el límite es ausencia en 25g ( $n=5$ ,  $c=0$ ).

Se utiliza la aplicación Danish Meat Research Institute Predictive Models for Meat (DMRI-PREDICT). Esta herramienta ha usado modelos matemáticos basados en los siguientes referencias bibliográficas:

- Gunvig, A. et al. (2007). A predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in meat products with seven different hurdle variables. In proceedings from 5th International Conference Predictive Modelling in Food, p. 197, Athens 2007.
- Mejlholm, O. et al (2010). Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* — An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. International Journal of Food Microbiology, Volume 141, Issue 3, 15 July 2010, Pages 137-150.

36

Se introdujeron los datos (Figura 5) necesarios para predecir el crecimiento de *L.monocytogenes* en productos cárnicos a diferentes temperaturas. De acuerdo con lo expresado en la Gráfica 4, según la temperatura en la que se almacena el producto se prevé una influencia directa en la concentración ( $\mu_{\max}$ ) de *Listeria monocytogenes*. Para una concentración inicial de 1 log10 CFU/g, hay una gran variabilidad en tiempo, dependiendo de la temperatura, en alcanzar 2 log10 CFU/g, que es el límite legal para comercializarse este producto.

A los 2°C, se alcanza la concentración de 100 CFU/g (2 log10 CFU/g) > 44 días con una  $\mu_{\max}$  (hour) de 0.0008, alcanzado el doble de su concentración en la fase exponencial (Doubling time) de 16,23 días y a los 12°C a los 6 días se alcanza las 100 CFU/g, con una  $\mu_{\max}$  (hour) de 0,0141 y Doubling time de 0,89 días. Esto nos indica que al igual que lo expresado por EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT for conducting

shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (versión 3, modificada 21/2/2019) no sólo hay que hacer las predicciones entre 5°C y 7°C, que es la recomendada para el almacenamiento de los productos refrigerados, si no que hay que hacerlo sobre temperatura de 12°C que es la temperatura que muchos estudios recogen como alcanzada en algún punto de la distribución o en los hogares de los consumidores. De hecho, (Schaffner D.W., 2013) indicaba que *Listeria monocytogenes* era la principal bacteria a estudiar cuando la temperatura estaba fuera de control ya que crece más rápidamente que *Salmonella* spp a temperatura ambiente y de refrigeración.

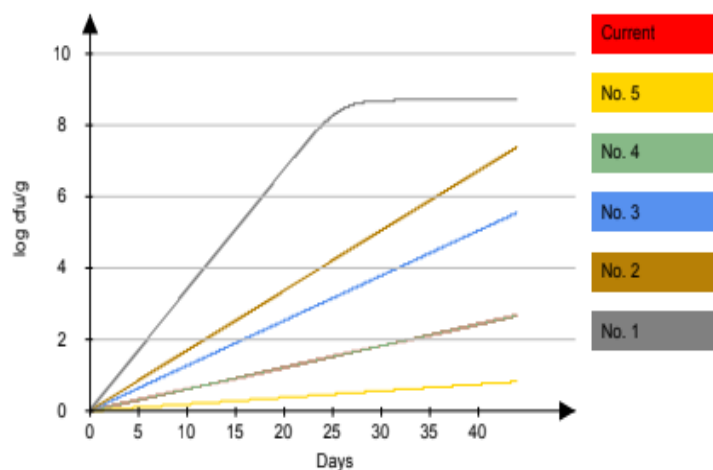
Comparando con los datos publicados por (Pérez-Rodríguez F., Carrasco E., Bover-Cid S., Jofré A., Valero A., 2017) obtenidos de la EU-wide baseline survey (BLS) para productos cárnicos tratados con calor con envase con oxígeno reducido y usados para construir una distribución exponencial indica que la media de la vida útil era de 33,66 días, al igual que lo expresado por DMRI a la temperatura (5°C) 33,0 días que es la temperatura recomendada en la literatura científica para el almacenamiento.

Como discusión se podría indicar que a diferencia de COMBASE o MICROHIBRO en las que se puede modificar la concentración inicial de partida, en el caso de DMRI PREDICTOR se marca por defecto la concentración inicial de 1 log<sub>10</sub> UFC/g. Con lo que esta herramienta sería útil para simular una contaminación cruzada postproceso en la industria, bien sea a través de superficies de contacto o por maquinaria contaminada y poder calcular el fabricante una vida útil con más seguridad.

Sería interesante también a los agentes del control oficial poder estudiar esta posibilidad en las industrias que de manera reiterada le aparecen positivos en las muestras tomadas para que con el fin de reducir el riesgo para la población y marcar un margen de seguridad mayor.

Growth of *Listeria monocytogenes* in meat products

Static Version 2.0 (October 2014)



| No. | Lactate/water | Acetate/water | Na-nitrite | pH  | NaCl/water | Water | Fat     | CO <sub>2</sub> | Temp. | $\mu_{max}$ (hour <sup>-1</sup> ) | Doubling time | 0.5 log cfu/g | 2 log cfu/g |
|-----|---------------|---------------|------------|-----|------------|-------|---------|-----------------|-------|-----------------------------------|---------------|---------------|-------------|
| 5   | 2.4500 %      | 0.0000 %      | 120 ppm    | 6.5 | 2.6 %      | 74 %  | <= 10 % | 0 %             | 2 °C  | 0.0008                            | 16.23 days    | 27.0 days     | > 44 days   |
| 4   | 2.4500 %      | 0.0000 %      | 120 ppm    | 6.5 | 2.6 %      | 74 %  | <= 10 % | 0 %             | 5 °C  | 0.0025                            | 4.97 days     | 8.3 days      | 33.0 days   |
| 3   | 2.4500 %      | 0.0000 %      | 120 ppm    | 6.5 | 2.6 %      | 74 %  | <= 10 % | 0 %             | 7 °C  | 0.0052                            | 2.39 days     | 4.0 days      | 15.9 days   |
| 2   | 2.4500 %      | 0.0000 %      | 120 ppm    | 6.5 | 2.6 %      | 74 %  | <= 10 % | 0 %             | 8 °C  | 0.007                             | 1.79 days     | 3.0 days      | 11.9 days   |
| 1   | 2.4500 %      | 0.0000 %      | 120 ppm    | 6.5 | 2.6 %      | 74 %  | <= 10 % | 0 %             | 12 °C | 0.0141                            | 0.89 days     | 1.5 days      | 6.0 days    |

Gráfica 4. Modelo predictivo de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en el jamón cocido realizado con DMRI-PREDICT

## 4.- Conclusiones:

1. Los modelos predictivos son recursos útiles para la investigación del cumplimiento legal de los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria.
2. Aportan información científica para la validación de la vida útil de los alimentos listos para el consumo.
3. Pueden ayudar a reformular productos o a diseñar productos nuevos con más seguridad en la comercialización.
4. Contribuye a reducir el trabajo experimental requerido para determinar y evaluar la seguridad de un producto sobretodo en las industrias de mediana o pequeña capacidad con menos presupuesto para ello.
5. Es una herramienta eficaz para el control oficial encargado de la vigilancia de las industrias alimentaria para establecer las verificaciones de la vida útil establecida por el operador económico para los productos fabricados y comercializados.
6. Para usar los modelos predictivos se necesita una adecuada caracterización del producto y conocimiento de las condiciones de conservación razonablemente previsible.

## 5.- Bibliografía:

Alapont Gutierrez C., Simón Soriano P., Torrejón Lanero MJ. (2020). *Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos*. (FEDACOVA, Editor) Obtenido de Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. Valencia: <https://www.fedacova.org/wp-content/uploads/2020/11/Guia-Determinaci%C3%B3n-Vida-%C3%A1til-2020.pdf>

ANSES. (2011). *Characteristics et sources of Listeria monocytogenes*. Obtenido de French agency for food, environmental and occupational health: (<https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0171FiEN.pdf>)

CAC. (2007). Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. (CAC/GL 61-2007), 1-30.

Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M. Zurero G. (2007). Survey of Temperature and Consumption Patterns of Fresh-Cut Leafy Green Salads: Risk Factors for Listeriosis. *Journal of Food Protection*, Vol. 70, No. 10 , 2407–2412.

Carrie M. Hew, Maha N. Hajmeer, Thomas B. Farver, James M. Glover, Dean O. Cliver. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* in experimental chorizos. *Journal of Food Protection*, Vol 68 nº 2 , 324-330.

Casquete R., Benito M., Martín A., Ruiz-Moyano S., Aranda E., Córdoba M. G. (2012). Microbiological quality of salchichón end chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. *Food Control* 24 , 191-198.

Conner D.E., Scott V.N., Bernard D.T. (1990). Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *Journal of Food protection* Vol 53 nº 8 , 652-655.

EFSA. (2003). The effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety. *The EFSA Journal* (2003) 14 , 1-31.

Encinas J., Sanz J.,García-López ML.,Otero A. (1999). Behaviour of *Listeria* spp.in naturally contaminates chorizo (Spanish fermented sausage). *International Journal of Food Microbiology* 46 , 167-171.

EURL Lm. (2014). *Technical guidance document for conducting shelf-life studies in Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*. (F. Maisons-Alfort, Ed.) Obtenido de EURL Lm\_Technical Guidance Document Lm shelf-life studies\_V3\_2014-06-06 (1).pdf. Version 3-06/06/2014

European Commission. (2005). Regulation (EC) nº2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuff. Official Journal of the European Union L 338(1).

Food Safety Authority of Ireland. (2017). Guidance n° 8: Determination of product shelf-life.

Garre Pérez A., Egea Larrosa J.A., Fernández Escámez P.S. (2016). Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *Anuario de Jóvenes Investigadores*, vol 9 , 160-163.

Gunvig A., Borggaard C., Hansen F., Hansen T.B., Aabo S. (2016). ConFerm e A tool to predict the reduction of pathogens during the production of fermented and matured sausages. *Food Control* 67 , 9-17.

Hew C.M., Hajmeer M.N., farver T.B., Glover J.M., Cliver D.O. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* in Experimental Chorizos. *Journal of Food Protection* 68 n° 2 , 324-330.

Hospital X.F, Hierro E., Fernández M. (2012). Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *International Journal of Food Microbiology* 153 , 395-401.

Hwang C., Shiowshuh S. (2011). Growth characteristics of *Listeria monocytogenes* as affected by a native microflora in cooked ham under refrigerated and temperature abuse conditions. *Food microbiology* 28 , 350-355.

Iñigo Nuñez S., Jimenez Manso A. (2012). *Guia de estudios de vida útil para Listeria monocytogenes en alimentos listos para su consumo*. Obtenido de Documentos técnicos de Higiene y Seguridad Alimentaria n° 6. Comunidad de Madrid: <https://www.comunidad.madrid/file/3546/download?token=rglW7Cfj>

Kent M. Sorrells, Davin C. Enigl, John R. Hatfield. (1989). Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* Vol. 52 n° 8 , 571-573.

Martin B, Garriga M., Aymerich T. (2011). Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at samall-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *J. Food Protect* 74 , 812-5.

Menéndez R.A, Rendueles E., Sanz J.J., Santos J.A., García-Fernandez C. (2018). Physicochemical and microbiological characteristics of diverde Spanish cured meat products. *CyTA-Journal of Food* Vol 16 N° 1 , 199-204.

Menéndez R.A., Rendueles E., Sanz J.J., Capita R., García-Fernández C. (2015). Behavior of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products packaged unader vacuum or modified atmosphere conditions. *Journal of Food Protection* 78 n° 10 , 1891-1895.

Muñoz A.I, Vargas M,Otero L,Díaz G,Guzmán V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C.,2002-2008. *Biomédica* , 31:428-39.

Nolan D.A., Chamblin D.C.,Troller J.A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology* 16 , 323-335.

Parlamento Europeo. (2006). 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. *Diario oficial de la Unión Europea* L204 , 10-22.

Pérez-Rodríguez F., Carrasco E., Bover-Cid S., Jofré A., Valero A. (2017). *Closing gaps for performing a risk assessment on Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) foods: Activity 2, a quantitative risk characterization on L. monocytogenes in RTE foods; starting from the retail stage*. EFSA Supporting Publications (EN-1252E).

Rubio Gonzalez A. et al. (2019). *Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo*. Comisión Institucional. AESAN.

Ruiz-Ramirez J., Serra X., Arnau J.,Gou P. (2005). Profiles of water content, water activity and texture in crusted dry-cured loin and in non-crusted dry-cured loin. *Meat Science* 69(3) , 519-525.

Schaffner D.W. (2013). Utilization of mathematical models to manage risk of holding cold food without temperature control. *Journal of Food protection* Vol 76 nº 6 , 1085-1094.

Simpson C.A., Geornaras I.,Yoon Y.,Scanga J.A.,Kendall P.A.,Sofos J.N. (2008). Effect of inoculum preparation procedure and storage time and temperature on the fate of *Listeria monocytogenes* on inoculated salami. *Journal of Food protection* Vol 71 nº 3 , 494-501.

Thévenot D., Dernburg A., Vernozzy-Rozand C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology* 101 , 7-17.

Tirado J., Paredes D.,Velazquez.,Torres J.A. (2005). Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Journal of Food* 5:1 , 66-76.

Tirloni E., Di Pietro V.,Rizzi G.,Pomilio F.,Cattaneo P.,Bernardi C., Stella S. (2019). Non-thermal inactivation of *Listeria* spp. in a typical dry-fermented sausage:"bergamasco" salami. *Italian Journal of Food Safety* Vol 8 , 8112.

Torres K., Sierra S., Poutou R., Carrascal A., Mercado M. (Junio de 2005). *Patogénesis de Listeria monocytogenes, microorganismo zoonótico emergente*. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682005000100003](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682005000100003)

Wijtzes T., McClure P.J., Zwietering M.H., Roberts T.A. (1993). Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 18 , 139-149.

Zwietering, M.H, Wijtzes T., Rombouts F.M, van't Riet K. (1993). A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. *Journal of Industrial Microbiology* 12 , 324-329.