

*Modelización del
crecimiento e
inactivación de Listeria
monocytogenes a
través del uso de
herramientas de
microbiología
predictiva en productos
cárnicos porcinos
crudo-curados y
cocidos*

Índice:

RESUMEN	2
SUMMARY	2
Índice de Figuras, Gráficos y Tablas	4
Abreviaturas y acrónimos:	6
1.- Introducción	7
2.- Objetivos	28
3.- Material y métodos	28
3.- Resultados y discusión:	35
3.1 Chorizo extra.	35
3.2 Salami extra.	45
3.3 Jamón cocido extra	48
4.- Conclusiones:	52
5.- Bibliografía:	54

RESUMEN

La listeriosis es una enfermedad transmitida por los alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*, siendo los alimentos listos para el consumo donde radica la mayor preocupación para la salud pública debido a la elevada magnitud de brotes que se producen anualmente por el consumo de estos alimentos contaminados. Esta bacteria es ubicua en los ecosistemas alimentarios debido a la gran capacidad que tiene para resistir en medio pudiendo permanecer viable en las superficies y en el utillaje de la industria alimentaria 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. Aunque todos los años se detectan resultados positivos a *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos y superficies recogidas por el control oficial en las que se superan los límites legales establecidos para su comercialización.

2

En esta investigación se usan distintas herramientas y programas informáticos de predicción microbiológica que permiten modelizar el crecimiento bacteriano para estos tipos de productos cárnicos. De este modo, es posible simular el comportamiento de *Listeria monocytogenes* bajo determinados factores intrínsecos de productos cárnicos elaborados por una empresa familiar de tamaño medio ubicada en la provincia de Jaén.

Palabras Clave: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, producto cárnico curado, producto cárnico cocido, chorizo, salami, jamón y microbiología predictiva.

SUMMARY

Listeriosis is a disease transmitted by food contaminated by *Listeria monocytogenes*, with ready-to-eat foods being of greatest public health concern due to the high magnitude of outbreaks that occur annually from the consumption of these contaminated food. This

Listeria en productos cárnicos porcinos: inocuidad y control.

bacterium is ubiquitous in food ecosystems due to its high capacity to resist in the environment and can remain viable on food industry surfaces and equipment for years.

Raw-cured and cooked meat products are considered foods with a low probability of causing a risk of listeriosis in the population due to their manufacturing process. However, positive results for *Listeria monocytogenes* are detected every year in food samples and surfaces collected by official control in which the legal limits established for the commercialization are exceeded.

In this research, different microbiological prediction tools and software are used to model bacterial growth for these types of meat products. In this way, it is possible to simulate the behaviour of *Listeria monocytogenes* under certain intrinsic factors of meat products produced by a medium-sized family business located in the province of Jaén.

Keywords: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, cured meat product, cooked meat product, chorizo, salami, ham and predictive microbiology.

Índice de Figuras, Gráficos y Tablas

Figura 1. Representación de los escenarios que puedan darse durante la vida útil de los alimentos	18
Figura 2. Curva de crecimiento microbiano tipo para una población bajo condiciones ambientales constantes	19
Figura 3. Determinación de percentiles en una distribución normal.	33
Figura 4. Condiciones de predicción de MicroHibro®, basadas en Seman et al. (2002).	34
Figura 5. Variables necesarias para hacer la predicción de crecimiento con DMRI-PREDICT.	35
Figura 6. Buscador de modelos mediante árbol de alimentos (microHibro®).	38
Figura 7. Modelos microbianos para alimento crudo-curado y parámetros cinéticos (microHibro®)	38
Gráfica 1. Modelo de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> a concentraciones iniciales 0 y 1 log10 en producto cárnico curado (microHibro).	39
Gráfica 2. Inactivación de <i>Listeria monocytogenes/innocua</i> a temperaturas (5,7,12°C), pH 4,8 y a_w 0,86 al inicio de la vida útil.	47
Gráfica 3. Inactivación de <i>Listeria monocytogenes/innocua</i> a temperaturas (5, 7, 12°C), pH 4,63 y a_w 0,79 al final de la vida útil.	48
Gráfica 4. Modelo predictivo de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en el jamón cocido realizado con DMRI-PREDICT.	51
Tabla 1. Factores intrínsecos que impactan en el crecimiento y supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	10
Tabla 2. Número de muestras oficiales analizadas positivas en productos cárnicos para detección de <i>Listeria monocytogenes</i> durante los años 2018-2022.	13
Tabla 3. Tipo de productos muestreados oficialmente positivos a <i>Listeria monocytogenes</i>	13
Tabla 4. Parámetros estimados para la distribución normal logarítmica (Log CFU/g) usada para describir la concentración inicial de <i>L. monocytogenes</i> en ALC en puntos de venta.	15

Tabla 5. Temperatura y duración de cada etapa de la cadena de distribución de alimentos.....	20
Tabla 6. Caracterización del chorizo formato vela, promedio serie histórica 2012-2020.	30
Tabla 7. Caracterización del Salami, promedio de la serie histórica 2012-2020.....	31
Tabla 8. Caracterización del Jamón cocido extra, promedio de la serie histórica 2012-2020.....	31
Tabla 9. Condiciones de predicción para el chorizo vela.	38
Tabla 103. Niveles de reducción de concentración máxima y tiempo lag a temperaturas de 5, 7 y 12°C) al inicio y al final de la vida útil.	46

Abreviaturas y acrónimos:

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos)

ALC: Alimentos Listos para el Consumo

a_w : actividad agua

AFSCoE: The Australian Food Safety Centre of Excellence

ASPs: Agentes de Salud Pública

BAL: Bacterias Ácido-Lácticas

BfR: Instituto Federal Alemán para el análisis de Riesgos

CFU: Unidad Formadora de Colonias

6

IFR: The United Kingdom Institute of Food Research

USDA-ARS: The United States Agriculture Department-Agricultural Research Service

OEA: Operador de Empresa Alimentaria

PCCs: Puntos de Control Crítico

1.- Introducción

La listeriosis es una enfermedad zoonótica producida por la bacteria *Listeria monocytogenes*, que se caracteriza por ser un bacilo grampositivo corto, regular, no esporulado ni ramificado, anaerobio facultativo, catalasa positiva, oxidasa negativa 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 patógenas 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 (OMSA, 2021).

Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida por la naturaleza y es un agente causal zoonótico relevante, especialmente en animales de renta. Se aísla en aguas residuales de ensilajes y del suelo, así como mantiene una alta capacidad de supervivencia de hasta 295 días. (Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A. y Mercado, M., 2005).

7

La listeriosis como enfermedad transmitida por los alimentos muestra una gran repercusión en salud pública, está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España del anexo I de la **Orden SSI/445/2015 de 9 de marzo**. Por lo tanto, está sujeta a ser declarados los casos humanos que sean diagnosticados por los servicios asistenciales con una frecuencia semanal con envío de los datos epidemiológicos básicos (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2015).

Los pescados ahumados, los productos lácteos, los productos cárnicos, las verduras y las frutas frescas son los alimentos principalmente implicados en brotes alimentarios causados por esta bacteria. Especialmente cuando en su presentación comercial se caracteriza por ser 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 a los alimentos listos para su consumo como aquellos “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” (Comisión Europea, 2005).

Estos alimentos, la mayoría refrigerados, tienen una vida útil prolongada y la presencia de *Listeria monocytogenes* se suele relacionar con una recontaminación antes de su envasado final, con la manipulación en el punto de venta o en el hogar del consumidor (Hwang C. y Shiowshuh S., 2011). Tampoco se puede obviar el riesgo inherente a los nuevos hábitos alimentarios, el paradigma actual de consumo de alimentos está evolucionando hacia un mayor consumo de alimentos que se sirven poco elaborados antes de su ingesta (Muñoz, A.I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G. y Guzmán, V., 2011). Tal es el caso del consumo de embutidos crudo-curados como el chorizo que es consumido ligeramente cocinados o incluso sin cocinar (Hew, C.M., Hajmeer, M.H., Farver, T.B., Glover, J.M. y Cliver, D.O., 2005).

El género *Listeria* tiene una capacidad de crecer a temperaturas de 0°C, lo que le confiere una especial facilidad de proliferación en alimentos refrigerados. Así mismo, dispone de una facultad 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 en ausencia o en baja concentración de oxígeno por lo que el envasado al vacío no representa un factor limitante para la proliferación de *Listeria* (Íñigo Nuñez S. y Jiménez Manso A., 2012). También se ha recogido en la literatura científica que existen subtipos de *Listeria monocytogenes* que son más termotolerantes que otros (Thévenot D., Dernburg A. y Vernozzy-Rozand C., 2006).

Simpson et al (2008) estableció que una carga microbiana de 10^4 CFU/g de *Listeria monocytogenes* en la matriz cárnica no fue inactivada durante el proceso de fermentación y secado. La bacteria patógena estaba presente a bajos niveles en la pieza de salami después de 12 semanas de almacenamiento en refrigeración (4°C) en formato de envasado al vacío (Simpson C.A., Geornaras I., Yoon Y., Scanga J.A., Kendall P.A. y Sofos J.N., 2008).

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 tales como son un bajo pH o bajas temperaturas ($< 10^{\circ}\text{C}$) por lo que el almacenamiento refrigerado no es garantía de protección frente al crecimiento de la *Listeria monocytogenes* (Sorrells, K.M., Enigl, D.C. y Hatfield, J.R., 1989) (Hospital, X.F, Hierro, E. y Fernández, M., 2012).

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

Tabla 1. Factores intrínsecos que impactan en el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*

Factores	Puede crecer			Puede sobrevivir* (pero no crece)
	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 (a _w)	0,90 a 0,93	0,99	> 0,99	< 0,90
Concentración de 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 durante la elaboración	Se requiere una combinación de temperatura/tiempo de 70° C durante 2 minutos para una reducción D-6 (es decir, 10 ⁶ o de 6 decimales) del número de células de <i>L. monocytogenes</i> . Otras condiciones 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.

Fuente: Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid (Íñigo Nuñez S. y Jiménez Manso A., 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 combinación concentración de sal y la temperatura. Se ha podido constatar que el efecto bactericida de diferentes ácidos que se empleaban en alimentación era mayor a temperaturas de 30°C y disminuía este efecto, mostrando un efecto bacteriostático a la temperatura de 10°C (Conner D.E., Scott V.N. y Bernard D.T., 1990).

Dentro de los alimentos listos para el consumo, los productos cárnicos crudo-curados y los preparados cárnicos, por sus características intrínsecas, son considerados como alimentos de bajo riesgo para producir listeriosis (Simpson C.A., Geornaras I., Yoon Y., Scanga J.A., Kendall P.A. y Sofos J.N., 2008) (Thévenot D., Dernburg A. y Vernozy-Rozand C., 2006). Aunque es cierto que suele aparecer contaminación en este tipo de alimentos de origen de animal con relativa frecuencia. En la tabla 2 queda reflejada esta circunstancia, ya que se han detectado muestras positivas en el periodo 2018 a 2023 en muestreos oficiales realizados por los Agentes de Salud Pública (ASPs) en las provincias de Jaén y Córdoba dentro del Programa de Control de Peligros Biológicos en Productos Alimenticios y que fueron analizadas en el Laboratorio de Salud Pública de la Delegación territorial de Salud y

Familias de Jaén. La magnitud de positividad a *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos de toda la serie histórica ha sido en el año 2021 en la provincia de Jaén con 7 muestras cárnicas positivas y el año 2023 con 3 muestras positivas en la provincia de Córdoba (tabla 2). Es interesante resaltar que el mayor esfuerzo analítico se produjo en el año 2019 en el que fueron tomadas 207 muestras oficiales en los OEA de la provincia de Jaén y 255 muestras oficiales en la provincia de Córdoba. Este gran esfuerzo analítico fue llevado a cabo en apenas cuatro meses como consecuencia de la notificación el 16 de agosto de 2019 por parte de la Dirección General de Salud Pública y Ordenación Farmacéutica del brote de toxiinfección alimentaria producida por *Listeria monocytogenes*. El Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social incorporó la información del brote de toxiinfección alimentaria por *Listeria monocytogenes* de Andalucía como una agrupación de casos humanos en el espacio y en el tiempo que estaban asociados al consumo de carne mechada industrial de la marca La Mechá, elaborada por la empresa Magrudis S.L. (Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2019).

Así mismo, en la tabla 4 se presentan cuáles fueron los tipos de productos cárnicos que habían sido identificados como positivos en los muestreos oficiales realizados por los ASPs durante el periodo comprendido entre 2018 y agosto de 2023. Se apreciaba que, por orden de importancia decreciente, los productos cárnicos más habituales en los que se identificó contaminación por *Listeria monocytogenes*, fueron los embutidos crudo-curados (salchichón y chorizo) y productos cárnicos cocidos (butifarra, morcilla blanca, queso de cerdo, york sándwich, lomo al ajillo y lomo de orza). Por lo que se aprecia la mayor relevancia del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los productos cárnicos crudo-curados aun a pesar de mostrar en la pieza un valor de a_w entre 0,84 y 0,86 y de pH 4,80 a 4,86 que implica un ambiente no proliferativo respecto a la bacteria. Aunque es cierto, que la cada vez más

habitual presentación del producto cárnico loncheado, envasado al vacío o en atmósfera modificada en formato blíster hace viable el crecimiento de la bacteria.

Tabla 2. Número de muestras oficiales analizadas positivas en productos cárnicos para detección de *Listeria monocytogenes* durante los años 2018-2022.

Provincia	2018			2019			2020			2021			2022			2023*		
	Nº de muestras analizadas	Positivas		Nº de muestras analizadas	Positivas		Nº de muestras analizadas	Positivas		Nº de muestras analizadas	Positivas		Nº de muestras analizadas	Positivas		Nº de muestras analizadas	Positivas	
		Nº	%		Nº	%		Nº	%		Nº	%		Nº	%		Nº	%
Córdoba	113	2	1,77	255	0	0	90	0	0	163	3	1,84	126	1	0,79	97	3	3,09
Jaén	95	1	1,05	207	5	2,42	89	0	0	142	7	4,93	124	5	4,03	97	5	3,09

* Muestras analizadas en el año 2023 hasta el 31/08/2023.

Fuente: Datos inéditos aportados por el Laboratorio de Salud Pública de Jaén.

Tabla 3. Tipo de productos muestreados oficialmente positivos a *Listeria monocytogenes*

2018	2019	2021	2022	2023
Salchichón	Butifarra	Morcilla blanca de cerdo y pollo	Fiambre loncheado	Lomo asado al ajillo
	Salchichón	Salchichón de cabezada	Chorizo	Salchichón mixto pollo y cerdo
	Salchichón extra de jabalí	Chorizo de pavo	Salchichón	Lomo de orza
	Chorizo oreado	Queso de cerdo	Butifarra	Chorizo de cerdo
	Salchichón casero	Salchichón	Queso de cerdo	
		Salchichón bellota		
		York sándwich		
		Chorizo casero		

Fuente: Datos inéditos aportados por el Laboratorio de Salud Pública de Jaén.

La literatura científica publicada indica que los productos cárnicos, incluidos los embutidos fermentados, se contaminan con frecuencia con *Listeria* spp, así las especies no patógenas tales como *L.innocua* y *L.welshimeri* son indicadoras de la presencia de *L.monocytogenes*. (Encinas, J., Sanz, J. ,García-López, M.L. y Otero A., 1999) y (Menéndez R.A., Rendueles E., Sanz J.J.,Capita R. y García-Fernández C., 2015). De hecho, numerosos estudios indican su presencia, en embutidos italianos con una prevalencia de oscila entre el 9% y el 45% y una concentración por debajo de 1 Log CFU/g, que en casos esporádicos se sitúa por encima de 3 Log CFU/g (Tirloni, E., Di Pietro, V., Rizzi, G., Pomilio, F. ,Cattaneo, P., Bernardi, C. y Stella S., 2019). Simpson et al en 2008 reportó un brote de listeriosis en el que fue aislada la bacteria en un salami, mostrando una concentración de 10^4 CFU/g de *L. monocytogenes* que no había sido eliminada durante el proceso de fermentación o secado y que permaneció viable durante 12 semanas a 4°C aun a pesar de estar envasada la pieza al vacío.

En un informe realizado por la EFSA sobre la evaluación del riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo se evidenció que, en los productos listos para la venta, productos cárnicos embutidos, se había encontrado una alta concentración media de esta bacteria (2,194 UFC/g). Sin embargo, en los productos cocinados se encontraron menores concentraciones (1,100 UFC/g) (tabla 4) (Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Bover-Cid, S., Jofré, A. y Valero A., 2017).

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.

Subcategoría del alimento	Media	Desv. típica	Perc. 50	Perc. 5	Perc. 95	Prob. Log	AIC	BIC
Cold smoked fish	0,867	1,842	1,248	0,394	4,620	-1,50x10 ³	3,12x10 ³	3,14x10 ³
Hot smoked fish	-0,271	0,943	1,318	-0,511	1,593	-1,79x10 ³	3,59x10 ³	3,60x10 ³
Gravad fish	1,011	1,913	1,236	0,524	4,950	-2,39x10 ²	4,83x10 ²	4,92x10 ²
Cooked meat	1,100	2,119	1,241	0,523	5,453	-7,10x10 ²	1,42x10 ³	1,44x10 ³
Sausage	2,194	2,704	1,151	1,598	7,482	-3,22x10 ¹	6,84x10 ¹	7,53x10 ¹
Pâté	1,461	2,334	1,213	0,852	6,240	-1,86x10 ³	3,73x10 ³	3,74x10 ³
Soft and semi-soft cheese	0,909	1,917	1,252	0,389	4,886	-3,14x10 ²	6,32x10 ²	6,46x10 ²

Perc.: percentil; Prob. Log.: probabilidad logarítmica; AIC: Criterio de Información Akaike; BIC: Criterio de Información Bayesiano.

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 (Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Bover-Cid, S., Jofré, A. y Valero A., 2017).

La presencia de este patógeno en el producto final también se relaciona con un riesgo potencial contaminación cruzada durante la fase de loncheado o envasado al contactar con una superficie contaminada. La prevalencia de contaminación por *Listeria* spp. en las industrias cárnicas pequeñas españolas que producen embutidos tradicionales muestra un patrón en el que destaca la contaminación de equipos y utillaje (11,8%), de la materia prima (28,95%) y del producto terminado (15,8%) (Martin, B, Garriga, M. y Aymerich T., 2011), (Encinas, J., Sanz, J., Garcia-López, M.L. y Otero A., 1999). En este sentido, es necesario recordar que *L. monocytogenes* tiene una alta capacidad supervivencia en la industria cárnica, una vez coloniza equipos y utillaje, en algunos estudios se apunta a que la bacteria una vez coloniza una instalación puede estar presente entre 1 y 3 años (Thévenot D., Dernburg A. y Vernozzy-Rozand C., 2006).

Por otro lado, los productos cárnicos refrigerados y mínimamente procesados cuando se someten a un tratamiento térmico moderado puede quedar un microbiota residual significativa (Tirado, J., Paredes, D., Velazquez, G. y 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* (Codex Alimentarius Commission, 2009) se

define como el período en que un alimento mantiene su seguridad microbiológica en unas condiciones adecuadas de almacenamiento a una temperatura especificada y en su caso, bajo unas condiciones determinadas de almacenamiento y manipulación. 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 (Comisión Europea, 2005).

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, puesto que el alimento haya sufrido un procesado que reduzca los niveles microbiológicos y no tenga posibilidad de verse recontaminado, de este modo, se rotula su periodo de vida útil con la mención “fecha de consumo preferente”.

Para los alimentos que no van a sufrir un tratamiento térmico y, por tanto, que permita eliminar o reducir a un nivel aceptable el peligro de *L. monocytogenes* y si se facilita 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** (Parlamento Europeo y Consejo, 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, en este escenario 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 de la vida útil de la matriz alimentaria 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:

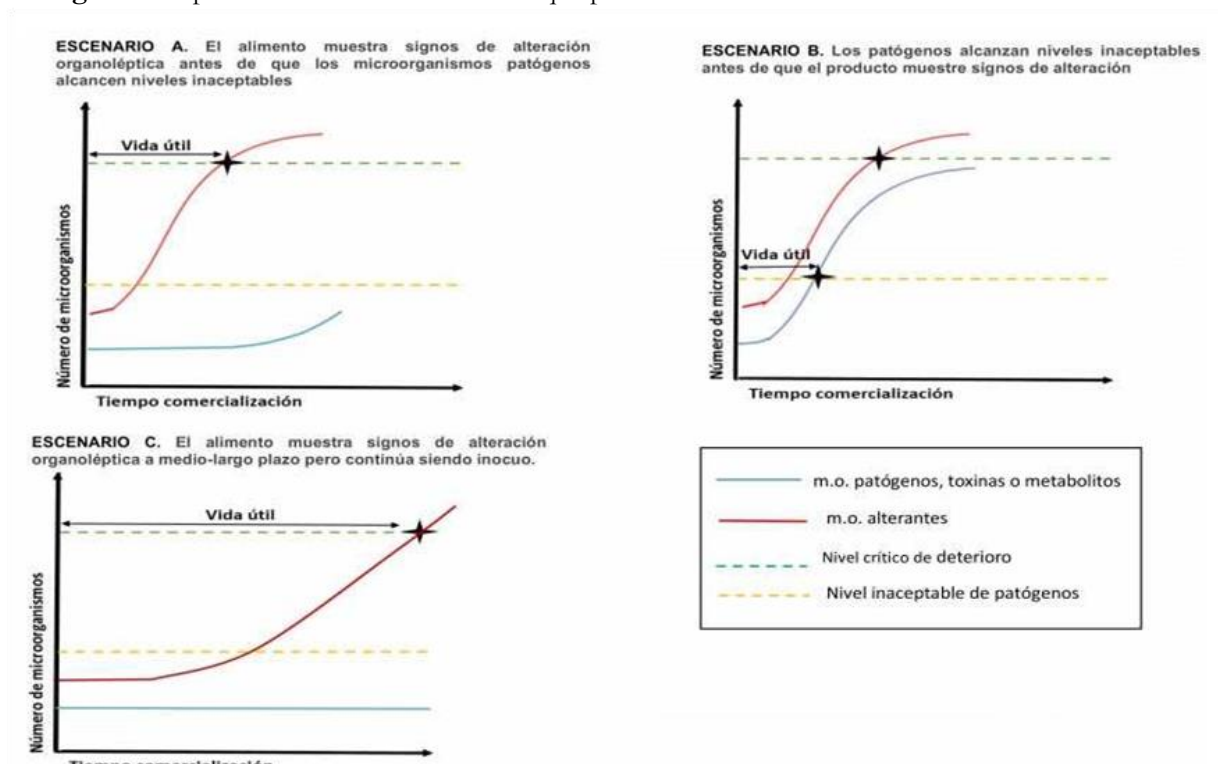
- El desarrollo de determinados componentes químicos causantes de la alteración del alimento (p.ej. Histaminas en el pescado)
- El desarrollo de microorganismos patógenos que harían del alimento un producto no seguro.
- El desarrollo de microorganismos alterantes, como las BAL (Bacterias ácido-lácticas),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

17

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: a_w , 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 que influyen en la respuesta microbiana son reproducibles, cuantificables y predecibles.

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



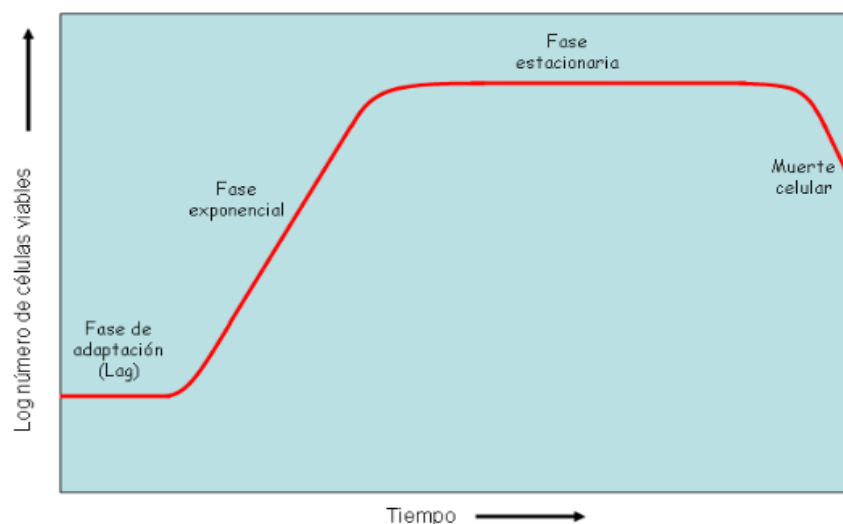
Fuente: Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos. FEDACOVA (2020). (Alapont Gutierrez, C., Simón Soriano, P. y Torrejón Lanero MJ, 2020).

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. y 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 (μ_{max}).
3. **Fase estacionaria:** Es una fase en donde se estabiliza el crecimiento y no varía el número 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.



Fuente: Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos. FEDACOVA (2020). (Alapont Gutierrez, C., Simón Soriano, P. y Torrejón Lanero MJ, 2020)

Por otro lado, es importante conocer la temperatura de distribución, de almacenamiento en el comercio y en el hogar ya que son altamente influyentes en la dinámica de crecimiento de este patógeno. (Íñigo Nuñez S. y Jiménez Manso A., 2012).

Dado que el fabricante indica la temperatura idónea en el etiquetado, muchas veces se desconoce cuáles son las temperaturas ciertas 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), se recomienda que se hagan los estudios basándose en escenarios en los que se combinen relaciones de tiempo-temperatura (Bergis, H., Bonanno, L., Asséré, A., y Lombard, B., 2021), tal y como se muestra en la tabla 5.

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

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	1/2 (vida útil - 7 días)
Conservación por el consumidor	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	1/2 (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.

Fuente: Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos, FEDACOVA, 2020 (Alapont Gutierrez, C., Simón Soriano, P. y Torrejón Lanero MJ, 2020)

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

Igualmente, en otro artículo científico se indicó que hay una gran variabilidad (>10°C) en las temperaturas de los frigoríficos domésticos entre el día y la noche, por lo que hace que se incremente de manera notable el riesgo de crecimiento de la bacteria (Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M. y Zurera, 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. Así se establece en su artículo 14 cuáles son los requisitos de seguridad alimentaria, destacando que el fabricante debe

comercializar un producto alimenticio seguro, para ello debe 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 (Parlamento Europeo y Consejo, 2002).

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 (Comisión Europea, 2005).

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

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

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 (6)	Productos comercializados durante su vida útil

(1) n = número de unidades que componen la muestra; c = número de muestras que dan valores entre m y M.

(2) m = M.

(3) Se utilizará la última versión de la norma.

(4) En circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a este criterio para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo: — los que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final).

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

(6) Sobre una placa de Petri de 140 mm de diámetro o tres placas de Petri de 90 mm de diámetro se siembra 1 ml de inóculo.

(7) Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 UFC/g durante su vida útil. (8) Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con $\text{pH} \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$, productos con $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

Fuente: Reglamento 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE).

Es importante indicar que la seguridad alimentaria hay que gestionarla mediante la vigilancia de los Puntos de Control Críticos (PCCs) fijados en el Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) del sistema de autocontrol de la empresa como es la vigilancia de los factores intrínsecos del producto como la a_w y el 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 tratamientos adicionales (Íñigo Nuñez S. y Jiménez 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 $\text{pH} < 4,4$ ó $a_w < 0,92$
- Productos con $\text{pH} < 5,0$ y $a_w < 0,94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Otros productos científicamente justificados, como los productos congelados.

23

Otra opción que tiene el operador económico de clasificar el producto como favorable o no del crecimiento de *L. monocytogenes* es con lo que se denomina 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 (Bergis, H., Bonanno, L., Asséré, A., y Lombard, B., 2021). 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 cuál debe ser el procedimiento técnico por seguir para realizar los estudios de vida útil.

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

- *Especificaciones de las características físicoquímicas del producto, como pH, a_w , 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.*

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, la microbiología predictiva, los estudios de durabilidad o ensayos de desafío (Íñigo Nuñez S. y Jiménez Manso A., 2012). Los estudios de durabilidad y los 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:

1. 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 o prerrequisitos y Plan APPCC).
2. Al potencial de crecimiento en ALC similares

3. 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., Wiltjes, T., Rombouts, F.M y 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 que son útiles en situaciones en las que se conocen las características fisicoquímicas del alimento y la temperatura de conservación o bien para predecir el comportamiento de los microorganismos en alimentos particulares, cualesquiera que sean sus condiciones de conservación (Wiltjes, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H. y Roberts T.A., 1993), (Garre Pérez, A., Egea Larrosa, J.A. y Fernández Escámez P.S., 2016).

25

Así se revelan los siguientes modelos:

- **Primarios:** la función matemática que se genera con parámetros cinéticos en función de la concentración de microorganismos (activación, inactivación, crecimiento y muerte) frente al tiempo transcurrido. Para Garre et al (2016) (Garre Pérez, A., Egea Larrosa, J.A. y Fernández Escámez P.S., 2016) los modelos más usados y de mayor aplicabilidad 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:** que integran los modelos primarios y secundarios en herramientas informáticas que traducen los datos que emanan de ellos a evaluación de calidad, de I+D, etc.

Por lo tanto, la microbiología predictiva es muy utilizada en seguridad alimentaria para predecir el crecimiento bacteriano en distintas condiciones que pueden ser modelizadas. Permite calcular 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 y optimizar la formulación (aditivos, pH, sal) para garantizar una mejor estabilidad del alimento. Así mismo, permite 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 es obtenido a partir de los estudios de laboratorio, suelen generar condiciones de crecimiento mejores que los obtenidos en el producto real (Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Bover-Cid, S., Jofré, A. y Valero A., 2017). Por lo que en los modelos de crecimiento predictivo para *L. monocytogenes* se producen unos niveles esperados de concentración en menor cantidad de tiempo, con lo que representaría un escenario más conservador.

Existen numerosas aplicaciones desarrolladas para ser usadas en microbiología predictiva, así 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. et al., 2019).

Son bases de datos que contienen información sobre los parámetros cinéticos y sobre cómo responde los microorganismos en diferentes entornos medioambientales. Proporciona una cuantificación microbiana, describiendo cómo los distintos

microorganismos en base a su carga microbiana, tanto alterantes como patógenos, cambian a lo largo del tiempo.

Entre ellas, las que se han empleado para realizar esta investigación aplicada 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.

27

<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 una importante nómina de empresas cárnicas y otras organizaciones. Predice el crecimiento de *L. monocytogenes* en relación con siete variables (temperatura, NaCl, pH, L-lactato, acetato, nitrito y CO₂) en el producto cárnico. <http://dmripredict.dk/>

2.- Objetivos

El objetivo de la investigación consiste en 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 con relación al crecimiento o inactivación de *Listeria monocytogenes*.

La intención de este estudio es analizar la utilidad y aplicabilidad de la microbiología predictiva para el operador económico alimentario como ayuda para calcular la vida útil de un producto cárnico. Así como, evaluar la utilidad de la microbiología predictiva para los agentes de control sanitario oficial que tiene entre sus funciones realizar la vigilancia sanitaria de estas industrias. Por último, analizar la utilidad de los programas informáticos basado en microbiología predictiva para realizar la verificación de la vida útil de los alimentos listos para su consumo en su fase de comercialización.

3.- Material y métodos

Para el desarrollo de la investigación se han escogido dos productos cárnicos crudo-curado y un producto cárnico cocido elaborados en una industria cárnica de mediana capacidad ubicada en la provincia de Jaén con una importante capacidad de fabricación y

una relevante actividad exportadora. Los productos escogidos han sido chorizo extra formato vela, salami extra formato vela y jamón cocido extra.

La metodología para la caracterización del riesgo microbiano a *Listeria monocytogenes* y su simulación de crecimiento ha consistido, primero, la recopilación de datos reales aportados por el operador de empresa alimentaria (OEA). De este modo se han manejado datos de controles reales llevados a cabo por los responsables de calidad durante los procesos de fabricación. Los datos reales de proceso han permitido recoger la variabilidad intrínseca a la fabricación y representan a los procedimientos de verificación implantados por el departamento de calidad de la empresa. Así se ha realizado un procedimiento diferenciado:

- Para el chorizo extra formato vela, se ha llevado a cabo una simulación de crecimiento de *Listeria monocytogenes* mediante el empleo de la aplicación de microbiología predictiva microHibro®.
- Para el salami extra formato vela, se ha seguido una simulación de inactivación de *Listeria monocytogenes* con la aplicación de microbiología predictiva COMBASE PREDICTOR.
- Para el Jamón cocido extra una simulación de crecimiento de *Listeria monocytogenes* con la aplicación de microbiología predictiva DMRI-PREDICT.

El criterio de elección y emparejamiento de cada herramienta de microbiología predictiva y cada matriz de producto cárnico se ha decidido en función a dos pautas, primera por las características fisicoquímicas de los productos y segunda por la existencia de modelos validados en cada aplicación.

a) Determinación de las características fisicoquímicas de los productos

Las características fisicoquímicas del chorizo extra formato vela, salami extra formato vela y jamón cocido extra han sido recogidas, cuantificadas y registradas por el OEA como control ordinario de verificación del proceso de fabricación y de manera diferenciadas por lote y producto.

En el caso del chorizo extra formato vela, salami extra formato vela y jamón cocido extra el OEA ha aportado los valores obtenidos de los controles de fabricación realizados a diferentes lotes recogidos durante un periodo de tiempo de diez años, de 2012 al 2022 (n=27). En las tablas nº 7, 8 y 9 se presentan los valores medios calculados a partir de la serie histórica citada.

Tabla 6. Caracterización del chorizo extra formato vela, promedio serie histórica 2012-2022.

Producto	Calibre de la pieza	Merma (% aproximado)	Contenido en sal (% en fresco)	Contenido en sal (% en producto mermado)	Nitrato sódico añadido (mg/l ó mg/kg)	Nitrito sódico añadido (mg/l ó mg/kg)	Conservante adicional (en caso de emplearse)	a _w producto acabado		pH producto acabado		Fecha de consumo preferente envase	Tipo de envasado y temperatura de conservación
								Media	SD*	Media	SD*		
Chorizo extra	80 mm	27	2	2,08	130	130	Cultivos Ácido-Lácticos	0,84	0,02	4,95	0,10	6 meses	Pieza formato vela en tripa de colágeno y envasado film. Temperatura de conservación <12°C. Envasado al vacío sobres de 90 g. Temperatura de conservación 0-8°C.

* Desviación Estándar o típica

Tabla 7. Caracterización del salami extra formato vela, promedio de la serie histórica 2012-2022.

Producto	Calibre de la pieza	Merma (% aproximado)	Contenido en sal (% en fresco)	Contenido en sal (% en producto mermado)	Nitrato sódico añadido (mg/1 ó mg/kg)	Nitrito sódico añadido (mg/1 ó mg/kg)	a _w producto acabado		pH producto acabado		Tipo de envasado y temperatura de conservación
							Media	SD*	Media	SD*	
Salami extra	92 mm	23	1,2	1,6	105	140	0,86	0,01	4,80	0,10	Pieza formato vela en tripa de colágeno y envasado film. Temperatura de conservación <12°C. Envasado al vacío sobres de 90 g. Temperatura de conservación 0-8°C.

* Desviación Estándar o típica

Tabla 8. Caracterización del jamón cocido extra, promedio de la serie histórica 2012-2022.

Producto	Humedad (% en producto acabado)	Contenido en sal (% en producto acabado)	Lactato (% añadido en producto final)	Nitrito Sódico añadido (mg/1 ó mg/kg)	Acetato sódico (% añadido en producto final)	a _w producto acabado		pH producto acabado		Tipo de envasado y temperatura de conservación
						Media	SD*	Media	SD*	
Jamón cocido extra	74,35%	1,9%	0,08%	120	0,13%	0,83	0,03	6,36	0,05	Pieza embutida en film transparente al vacío. Temperatura de conservación <8°C.

* Desviación Estándar o típica

b) Recuperación de bibliografía científica

Se ha planteado una estrategia de búsqueda en bases de datos referenciadas, multidisciplinarias y temáticas, bajo el criterio de recuperación de información relacionada con microbiología predictiva, *Listeria monocytogenes* y productos cárnicos. Fueron planteados dos perfiles de recuperación de información: i) Procedente de bases de datos referenciales tales como MEDLINE, Google Scholar, ScienceDirect, Scopus, Web of Science y ii) Procedente de buscadores de las bases de datos incluidas en las aplicaciones de microbiología predictiva como librería específica (por ejemplo, COMBASE PREDICTOR).

c) Históricos de datos

El OEA viene realizando muestreos de manera regular tanto en superficies de utillaje y equipos como en materias primas. De este modo su plan de muestreo ha incluido controles ambientales de contaminación de las instalaciones, así como controles de calidad microbiológica de las materias primas y producto acabado. En su histórico de controles analíticos que viene realizando desde el año 2012 el OEA no se ha hallado ningún resultado positivo a *Listeria monocytogenes*.

Como estrategia de verificación, el OEA realiza controles analíticos en productos intermedios de fabricación y en productos acabados listos para su comercialización. De este modo se da cumplimiento al mandato de verificación del sistema de autocontrol que tiene implantado el OEA y se cumple con la legalidad vigente que estipula la responsabilidad de que el fabricante garantice la aptitud, seguridad e inocuidad de los productos cárnicos puestos en el mercado. De igual modo, el OEA en su histórico de controles analíticos que viene realizando desde el año 2012 no ha hallado ningún resultado positivo a *Listeria monocytogenes*.

A continuación, se exponen los criterios de funcionamiento y operabilidad de las tres herramientas de microbiología predictiva que han sido utilizadas para realizar la investigación.

I. Variabilidad de las muestras. RED BIOQURA

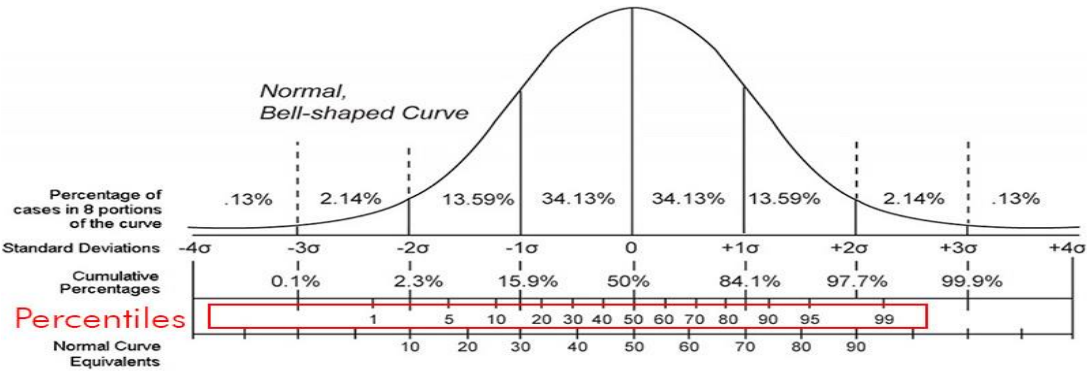
La RED BIOQURA es una herramienta estadística que permite evaluar la consistencia de los datos incorporados a un histórico de resultados analíticos. Está disponible en internet (<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>) y permite calcular el límite superior del intervalo de confianza, considerando un nivel de confianza determinado que generalmente suele oscilar entre el 95 y el 99%. De este modo, introduciendo el número

de muestras positivas respecto a la totalidad de muestras analizadas, la herramienta computa de forma sencilla el intervalo de confianza a 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, lo que significa que se asume 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.

II. Cálculo del nivel de percentil

El percentil es un valor usado en estadística por el que se divide un conjunto de datos ordenados en cien fragmentos correspondientes al 1%. Con los datos aportados por el OEA se calcula el nivel 95% de percentil para los valores de a_w y pH, con lo que se adopta una postura conservadora a la hora de hacer el estudio, ya que en el escenario más alto de a_w y cercanos a la neutralidad en el pH el crecimiento de la bacteria está favorecido (Bover i Cid, S. y Garriga i Turón, M., 2014).

Figura 3. Determinación de percentiles en una distribución normal.



III. Aplicación de modelos matemáticos con microbiología predictiva

En las herramientas informáticas que permiten aplicar modelos de microbiología predictiva para emular el crecimiento o inactivación microbiana es necesario aportar

una información relacionada con el control del proceso de fabricación del producto cárnico. Se va a trabajar con las siguientes herramientas de microbiología predictiva:

COMBASE PREDICTOR

- Modelo: Estático
- Microorganismo: *Listeria monocytogenes/innocua*
- Número de microorganismos inicial: 0 log UFC/g, 1 log UFC/g
- Condiciones de almacenamiento más desfavorable de pH y temperatura
- Concentración de NaCl
- Estado fisiológico de las células: El prefijado por COMBASE para este microorganismo: $2 \cdot 10^{-2}$

MicroHibro®

En la figura 4 se describe cuáles son las condiciones de predicción que están definidas en la operación de la herramienta informática y el rango de variación preestablecido para cada una de ellas.

Figura 4. Condiciones de predicción de MicroHibro®, basadas en Seman et al. (2002).

Seman et al. (2002)

CONDICIONES DE PREDICCIÓN

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

NIVEL DE INTERÉS / UMBRALES

Nt (log10(count))	2	Rango: [N0,Nt]
----------------------	---	----------------

Danish Meat Research Institute Predictive Models for Meat (DMRI-PREDICT)

En la figura 5 se expone las condiciones de predicción establecidas para la operación de la herramienta informática y el rango de variación predefinido para cada una de ellas.

Listeria en productos cárnicos porcinos: inocuidad y control.

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

Static Version 2.0 (October 2014)

Recipe variables ☒ **Multiple**

Na-lactate in recipe	0.0 %	☐
Na-acetate in recipe	0.00 %	☐
Na-nitrite in recipe	0 ppm	☐
pH in final product	0 *	☐
NaCl in final product	0 % *	☐
Water in final product	0 % *	

Product type

☒ Whole muscle product ($\leq 10\%$ fat)

☐ Emulsified product ($> 10\%$ fat)

Storage variables

Added CO ₂	0 %	☐
Temperature	0 °C *	☐
L. monocytogenes count at time zero (cfu/g)	1	

Note

3.- Resultados y discusión:

3.1 Chorizo extra.

Características fisicoquímicas de los productos cárnicos

35

Respecto a los valores medios fisicoquímicos aportados por el fabricante, en el caso del **chorizo extra vela** presentaba un valor de pH de $4,95 \pm 0,10$, acorde a lo indicado por otros autores para este tipo de producto encontrado en la literatura científica (Menéndez, R.A, Rendueles, E., Sanz, J.J., Santos, J.A. y García-Fernandez C., 2018) para este tipo de producto. Estos valores se encuentran dentro del rango de baja acidez propio de los productos cárnicos fermentados en España. Con respecto a la a_w el valor obtenido es bajo , $0,84 \pm 0,02$, valor que también se halla dentro de los valores para este tipo de productos cárnicos (Ruiz-Ramirez, J., Serra, X., Arnau, J. y Gou P., 2005) (Casquete, R., Benito M., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E. y Córdoba M. G., 2012) y (Hew C.M., Hajmeer M.N., Farver T.B., Glover J.M., Cliver D.O., 2005).

Respecto al factor contenido en sal (NaCl), el dato aportado por el OEA sobre la composición cuantitativa del chorizo extra formato vela fue del 2,08% en producto mermado y del 2 % en producto fresco. Este valor concuerda con los resultados aportados por otros autores en investigaciones previas realizadas para este tipo de productos cárnicos (Menéndez, R.A, Rendueles, E., Sanz, J.J., Santos, J.A. y García-Fernandez C., 2018)

Por último, respecto a los valores de agentes conservantes, el OEA indicó que se añadía 130 mg/l ó mg/kg de nitrato sódico y 130 mg/l ó mg/kg de nitrito sódico.

Variabilidad de las muestras: RED BIOQURA

En la tabla 7 se han recogido los datos globales aportados por la empresa cárnica para un total de 27 muestras del periodo 2012 a 2020.

Con estos parámetros reales de a_w , pH y aditivos (nitrato y nitro sódico) se introducen en la aplicación “RED BIOQURA” y se obtiene 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
a_w media: 0.8	Proporción de muestras con un a_w superior al admisible Se estima un porcentaje del 0 % Eso es, 0 unidades de cada 1000.
Desv. standard del a_w: 0,02	
Número de medidas: 27	
a_w máximo admisible 0,92	

Y con respecto al valor del pH, se corresponde al 100% de las muestras con un resultado superior al admisible.



Por lo que tomando como referencia el Anexo I del Reglamento (CE) 2073/2005 se ha categorizado como ALC no favorecedor del crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Cálculo del nivel percentil

37

Según los cálculos previos realizados en Excel® con los datos reales aportados por la empresa para un percentil de 95%, la a_w es de 0,90 y para el pH 5,0. (Tabla 7). Con estos resultados y en virtud a la nota 8 del Anexo I del Reglamento (CE) 2073/2005 este producto es considerado como 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®.

A partir de la categoría del producto cárnico estudiado (producto cárnico crudo-curado) se ha consultado en el “Buscador de modelos mediante árbol de alimentos” de la aplicación informática (Figura 6). Ha sido seleccionado el modelo Seman *et al.* 2002 (metadatos tabla 13) ya que es el que mejor se ajustaba a los parámetros cinéticos

aportados por el OEA (a_w , pH y aditivos). Por lo tanto, en este ensayo ha sido seleccionado el modelo Baranyi&Roberts (1994) como función primaria y Seman *et al.* 2002 como función secundaria μ_{max} (figura 7).

Figura 6. Buscador de modelos mediante árbol de alimentos (microHibro®).

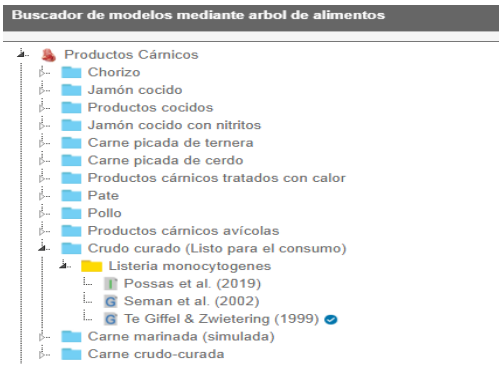


Figura 7. Modelos microbianos para alimento crudo-curado y parámetros cinéticos (microHibro®).

#		Alimento/ Variable-Respuesta	Primaria/Secundaria o Terciaria	Parámetros						
		Crudo curado (Listo para el consumo)	Baranyi & Roberts (1994)_log10(mu)	y0	umax	lag	m	ymax	t	
185	Listeria monocytogenes		Seman et al. (2002); Listeria monocytogenes; Ready-to-eat meat	1.00 log10(count)	0.001 log10(count/h)	0.0 h	1.00 Dimensionless	9.0 log10(count)	75.258 d	
		Crudo curado (Listo para el consumo)	Baranyi & Roberts (1994)_log10(mu)	y0	umax	lag	m	ymax	t	
185	Listeria monocytogenes		Seman et al. (2002); Listeria monocytogenes; Ready-to-eat meat	0.00 log10(count)	0.001 log10(count/h)	0.0 h	1.00 Dimensionless	9.0 log10(count)	150.515 d	

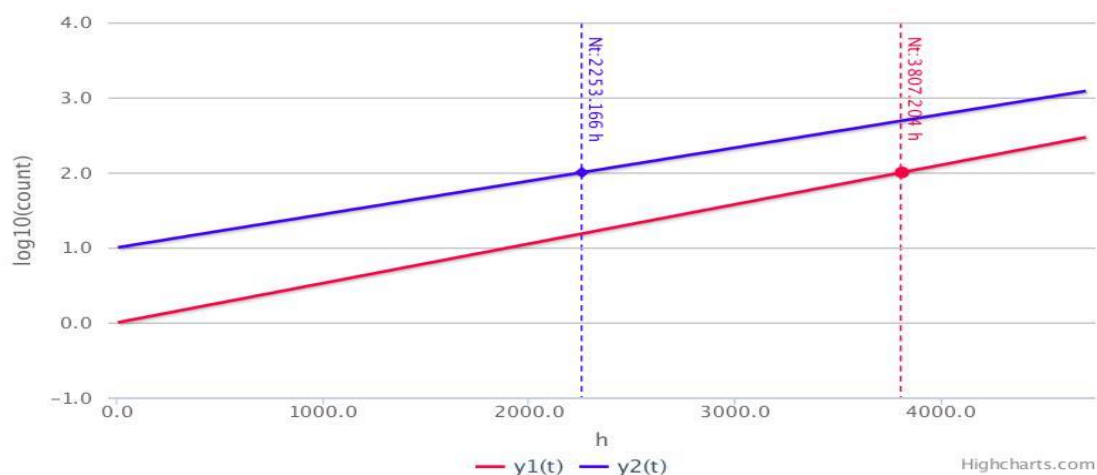
Las condiciones de predicción estimadas para las ecuaciones matemáticas que el programa microHibro® ha ejecutado quedan recogidas en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de predicción para el chorizo extra formato vela.

Condiciones de predicción		
Yo (Log 10)	NaCl%	Nivel de interés/Umbral (Nt) log10
0	2,8	2
1	2,8	2

Así como, se obtuvo la siguiente gráfica que representaba un modelo microbiano de crecimiento 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 el chorizo extra formato vela en alcanzar el valor límite legal de 2log10 (100ufc/g) sería de 3807,204 horas, lo que representaría a 158 días o 5,28 meses. En el escenario de una concentración inicial de 1log10 UFC/g los valores serían de 2253.166 horas, o lo que es lo mismo que 93,88 días o 3,12 meses. Los datos calculados para la estimación de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en este producto cárnico han sido recopilados en la tabla 12.

39

En este escenario, el OEA había establecido una vida media de 6 meses, aunque según el modelo predictivo el nivel máximo permitido de 100 UFC/g lo podría alcanzar a los 5,28 meses. Por lo tanto, sería recomendable que el fabricante redujese el tiempo de vida útil estimada para mayor seguridad, a la vez que debería de ir comparándolo con los datos analíticos del chorizo extra formato vela al final de su vida útil asignada.

El escenario en el que se simula una concentración inicial de 1log10 UFC/g, sería el recomendable para este tipo de cálculos. Esencialmente por el hecho de que este nivel de contaminación por *Listeria spp* ha sido identificado por varios autores (Casquete, R.,

Benito M., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E. y Córdoba M. G., 2012) que apuntaban a niveles de contaminación de materias primas al inicio del proceso de fabricación. O bien a niveles de contaminación durante el proceso de manipulación en el punto de venta con el concurso de máquinas del loncheado contaminadas (Silva, R., Pereira, J., Rouxinol, M. y Patarata, L., 2020).

Los nitritos y nitratos que son añadidos a la producción de los productos cárnicos representan una barrera que impide el crecimiento de la *Listeria monocytogenes*. La adición de estas sustancias, en la Unión Europea, está regulado por el **Reglamento (CE) 1333/2003** (Parlamento Europeo y del Consejo, 2008) que fija entre otros los valores límite de nitratos y nitritos. En el caso de productos cárnicos no sometidos a tratamiento térmico, crudo-curados el valor límite es de 150 mg/l ó mg/kg para cada tipo de aditivo. El escenario de uso de estos aditivos es más restrictivo cada vez, con la excepción de los productos cárnicos tradicionales salchichón y chorizo tradicionales de curación larga y productos similares (maduración de treinta días como mínimo) en los que los valores límite definidos son de 250 mg/l ó mg/kg para los nitratos. El criterio fijado por la AESAN en la Comisión Institucional de 18 de septiembre de 2020 sobre uso de aditivos en productos cárnicos tradicionales curados (AESAN, 2020) permite que el OEA se adapte a los niveles amparados por el Reglamento (CE) 1333/2003 para los citados productos. Así quedó recogido en el Anexo III del Real Decreto 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se modifica el Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007).

Por ello, el uso de esta herramienta resulta de gran utilidad ya que al predecir el comportamiento de este microorganismo puede operarse con un uso de valores más

bajos de estos conservantes. Por lo tanto, la interacción de las variables de fabricación que comportan las características intrínsecas de estos productos, la estimación de la carga inicial de microorganismos y el uso de aditivos son factores esenciales a tener en cuenta a la hora de controlar este patógeno en el embutido (Hospital, X.F, Hierro, E. y Fernández, M., 2012).

En el modelo usado en microHibro® no emplea la variable temperatura para predecir el crecimiento, en cambio establecieron en su estudio (Hew, C.M., Hajmeer, M.H., Farver, T.B., Glover, J.M. y Cliver, D.O., 2005) como la temperatura y el tiempo de almacenamiento son factores influyentes en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en el chorizo. Así, Hew et al (2005) resaltaron 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, G. y Torres J.A., 2005).

Tabla 11. Estimación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en relación con el tiempo de fabricación del chorizo extra formato vela en microHibro®.

#	T	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
	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. Metadatos: Función Primaria: Baranyi&Roberts (1994) y función secundaria: Seman et al (2002).

METADATOS
Id: 185
Nombre: Seman et al. (2002)
Descripción: Growth model proposed for <i>Listeria monocytogenes</i> 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: <i>Listeria monocytogenes</i>
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) $_{\log 10(\mu)}$
Ecuación: $+y_0 + (u_{\max} * (t - \text{lag} + (\ln(1 - \exp(-u_{\max} * \ln(10) * t) + \exp(-u_{\max} * \ln(10) * (t - \text{lag}))) / (u_{\max} * \ln(10)))) - (1 / (m * \ln(10))) * \ln(1 + ((\exp(m * u_{\max} * \ln(10) * (t - \text{lag} + (\ln(1 - \exp(-u_{\max} * \ln(10) * t) + \exp(-u_{\max} * \ln(10) * (t - \text{lag}))) / (u_{\max} * \ln(10)))) - 1) / (\text{pow}(10, m * (y_{\max} - y_0)))))$
Coeficientes:
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 $u_{\max}$:
Nombre: Seman et al. (2002); <i>Listeria monocytogenes</i> ; Ready-to-eat meat
Ecuación: $((0.07979 + (-0.00595 * \text{NaCl} + (-0.13692 * \text{DiacetateNa}) + (-0.03490 * \text{LactateK}) + (0.00074 * \text{moisture}) + (0.00286 * \text{pow}(\text{LactateK}, 2)))) / 168$
Coeficientes:
Referencias:
Modeling the growth of <i>Listeria monocytogenes</i> 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).

3.2 Salami extra.

En relación a los datos fisicoquímicos analizados por el OEA que se recogen en la tabla 8, observamos que acorde con el **Reglamento (CE) 2073/2005 Anexo I**, el producto cárnico 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” **(Comisión Europea, 2005)**.

De acuerdo con esta categorización, en la aplicación COMBASE PREDICTOR se inicia la simulación seleccionando el modelo en caldo “Non-thermal survival” para analizar cómo se comportaría la bacteria *Listeria monocytogenes* asignando unos parámetros de a_w 0,86 y pH 4,80 a escenarios de refrigeración 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 4, modificada 4/7/2021) (Bergis, H., Bonanno, L., Asséré, A., y Lombard, B., 2021)**.

45

Se obtuvo el siguiente resultado (tabla 13) en el que se apreciaba una predicción de reducción 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. y Stella S., 2019). Así Tirloni et al (2019) planteaban un ensayo en el que usaron bacterias ácido lácticas (BAL) provenientes de un cultivo iniciador o starter que les permitía partir de una situación con una alta carga microbiana inoculada en una masa del salami. Este producto cárnico mostraba por lo tanto un valor bajo pH debido a la acidificación causada por el crecimiento de las BAL, unido a las altas temperaturas que se alcanzaba en la pieza de salami durante la fase de secado.

Por otro lado, en la fase de latencia (lag time), como consecuencia de un escenario de cambio gradual de temperatura inherente a las oscilaciones térmicas experimentadas en la

conservación del producto. Esta situación muestra un acortamiento en la duración de la misma, debido a que en esta fase el microorganismo se va adaptando paulatinamente al medio.

Tabla 13. Niveles de reducción de concentración máxima y tiempo lag a temperaturas de 5, 7 y 12°C) al inicio y al final de la vida útil.

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

En la tabla 13, se podía observar una disminución en el log conc/h que se va acelerando conforme se aumenta la temperatura del producto cárnico, tanto al inicio como al final de la vida útil. Este efecto se podía explicar como consecuencia de la reducción de los valores de pH y de la **a_w**, ya que hacen que no se produzca el crecimiento del patógeno. La combinación de microorganismos presentes en la masa y las características físicoquímicas del salami actúan limitando el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. El potencial de crecimiento (d) es < 0.5 log 10 UFC/g por lo que el producto cárnico podría ser clasificado como categoría 1.3.

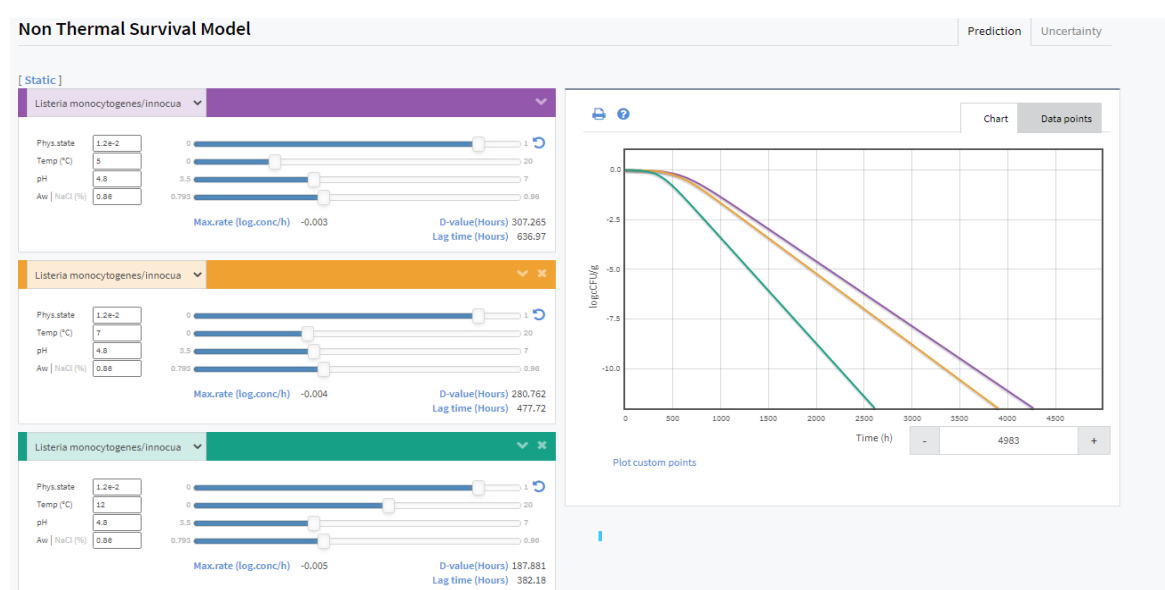
Este tipo de ejercicios de simulación presentan una gran ventaja ya que permiten ser replicados en escenarios de variación de la composición del producto cárnico. La simulación de distintos procesos de fabricación y el uso de distintos ingredientes o en diversas concentraciones que componen la ficha técnica de fabricación del producto permite al responsable de calidad adoptar decisiones motivadas sobre el crecimiento microbiano, así como ajustar la formulación para fabricar un producto seguro.

De hecho, los planteamientos de la capacidad intrínseca asignada a los embutidos crudos-curados como el salami de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es cuestionable. Ya que existe suficiente evidencia científica del riesgo de recontaminación del producto cárnico y la capacidad de crecimiento de la bacteria en las fases de distribución o en el punto de venta. Es importante resaltar que el riesgo de proliferación se relaciona con el origen de la contaminación, con la temperatura de almacenaje y con el tiempo que media entre la contaminación y el consumo del producto (Simpson C.A., Geornaras I., Yoon Y., Scanga J.A., Kendall P.A. y Sofos J.N., 2008).

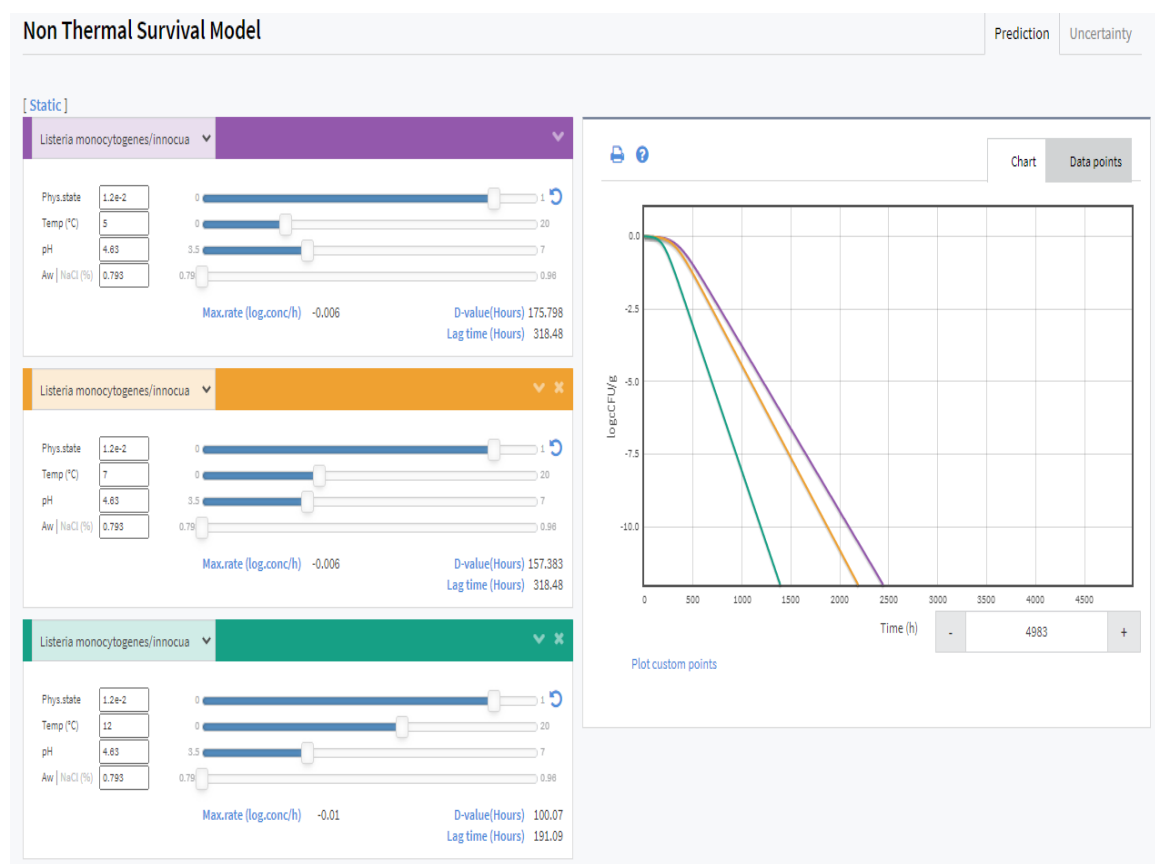
La aplicación DMRI-PREDICT dispone asimismo de un modelo de inactivación validado para lo cual requiere el manejo de seis variables que son: porcentaje de NaCl añadido a la mezcla, nitritos añadidos expresados en mg/l ó mg/kg, pH a las 48h, pH final, total de peso perdido o merma y la humedad del producto al final del proceso (Gunvig, A., Borggaard, C., Hansen, F., Hansen, T.B. y Aabo, S., 2016). En este sentido, microHibro[®] también dispone de una opción que permite trabajar con modelos microbiológicos de inactivación.

47

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



Gráfica 3. Inactivación de *Listeria monocytogenes/innocua* a temperaturas (5, 7, 12°C), pH 4,63 y a_w 0,79 al final de la vida útil.



48

3.3 Jamón cocido extra.

A partir de los valores fisicoquímicos reales aportados por el OEA, tabla 9, se caracterizó al producto cárnico cocido expresado en base a los criterios definidos en el **Anexo I del Reglamento (CE) 2073/2005**. El jamón cocido extra es catalogado 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”. El Reglamento indica dos situaciones diferenciadas y por ende establece dos valores límite alternativos. El primero, se refiere al producto que ha sido comercializado durante su vida útil, estableciendo un valor límite de 100 UFC/g ($n=5$, $c=0$). El segundo, corresponde a un contexto en el que el producto se mantiene bajo la responsabilidad y control inmediato del OEA que lo ha producido, en ese caso el valor límite es de ausencia en 25g ($n=5$, $c=0$).

La aplicación Danish Meat Research Institute Predictive Models for Meat (DMRI-PREDICT) se sustenta en el manejo de diferentes modelos matemáticos que permiten la simulación del crecimiento microbiano. Gunvig et al (2007) avanzó el funcionamiento de la herramienta de simulación de crecimiento microbiano sobre el manejo de siete variables diferenciadas del control del proceso productivo (Gunvig, 2007). Así como Mejholm et al (2010) realizaron modelizaciones de crecimiento microbiano en productos de la pesca y productos cárnicos cocidos y crudo-curados mediante el uso de la herramienta DMRI (Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, K., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D. y Dalgaard, P., 2010).

Para realizar el ensayo de microbiología predictiva con la herramienta DMRI-PREDICT se introdujeron los datos de las siguientes variables que fueron aportadas por el OEA (figura 5) lactato sódico, nitrito sódico, pH en producto acabado, NaCl en producto acabado, a_w en producto acabado y $\leq 10\%$ de grasa. A partir de la incorporación de las seis variables se podía generar los resultados que predecían el crecimiento de *L.monocytogenes* en productos cárnicos a diferentes temperaturas como 2°C, 5°C, 7°C, 8°C y 12°C.

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 (μ_{max}) de *Listeria monocytogenes*. Para una concentración inicial de 1 log₁₀ CFU/g, hay una gran variabilidad en el tiempo, dependiendo de la temperatura, que transcurre hasta alcanzar una concentración de 2 log₁₀ CFU/g, que es el valor límite legal que permite que sea comercializado el producto cárnico.

A los 2°C, se alcanza la concentración de 100 CFU/g (2 log₁₀ CFU/g), en esta simulación el valor límite se alcanza a más 44 días con una μ_{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 μ_{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 4, modificada 4/7/2021) (Bergis, H., Bonanno, L., Asséré, A., y Lombard, B., 2021). No sólo hay que hacer las predicciones entre 5°C y 7°C, que es la recomendada para el almacenamiento de los productos refrigerados, sino 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 incluso en los hogares de los consumidores. De hecho, (Schaffner D.W., 2013) indicaba que *Listeria monocytogenes* era la principal bacteria que debía ser estudiada en situaciones en las que existiese una posibilidad de que la temperatura de conservación del producto cárnico no estuviese garantizada. Esencialmente *Listeria* era la bacteria de referencia por la ventaja competitiva que mostraba respecto a *Salmonella*, debido a que presentaba un crecimiento más rápido que ésta última tanto a temperatura ambiente como a temperatura de refrigeración.

50

Pérez-Rodríguez et al (2017) indicaban que según los resultados obtenidos de la EU-wide baseline survey (BLS) para productos cárnicos tratados con calor en envase con oxígeno reducido. Se trataba del escenario correspondiente a una distribución exponencial media que permitió calcular la vida útil y establecerla en un valor de 33,66 días (Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Bover-Cid, S., Jofré, A. y Valero A., 2017). Este resultado era coincidente con el valor calculado con el uso de herramienta DMRI-PREDICT, para una temperatura de 5°C, como valor térmico recomendado por la literatura científica, la vida útil obtenida fue de 33,0 días.

De la comparación de las tres herramientas se apreciaba consideraba que en el caso de COMBASE o microHibro® era posible modificar los valores de concentración inicial de partida, sin embargo, en el caso de la herramienta DMRI-PREDICT por defecto quedaba

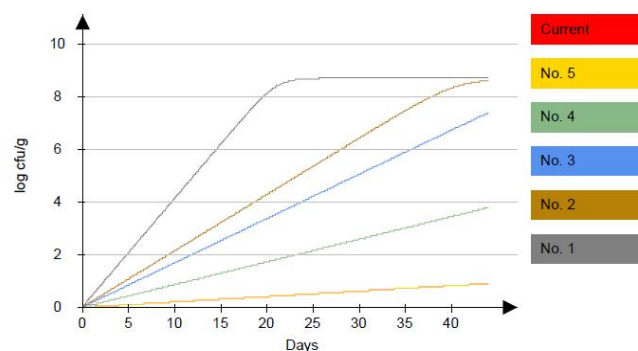
establecida una concentración inicial de 1 log₁₀ UFC/g. En consecuencia, ésta herramienta resultaba de gran utilidad para simular situaciones de contaminación cruzada postproceso en la industria alimentaria. Bien fuese mediante la colonización de superficies de contacto o mediante la contaminación de los equipos, así el OEA podía calcular la vida útil con un mayor margen de seguridad.

Resulta de gran interés que los agentes del control oficial pudiesen analizar los resultados obtenidos de los ensayos de crecimiento microbiano generados por los OEAs. Especialmente en aquellas empresas que mantienen una cierta recurrencia de muestras alimentarias positivas en los procedimientos de verificación de su sistema de autocontrol, o bien en las muestras tomadas por los agentes de control sanitario oficial. Además, el uso de DMRI-PREDICT[®] supone una garantía para el OEA en el establecimiento de las fechas de caducidad y en apoyo a los Challenge test para ofrecer las máximas garantías de inocuidad alimentaria.

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

Growth of *Listeria monocytogenes* in meat products

Static Version 2.0 (October 2014)



History

No.	Na-lactate	Na-acetate	Na-nitrite	pH	NaCl	Water	Fat	CO ₂	Temp.	μ_{max}	Doubling time	0,5 log cfu/g	2 log cfu/g	Delete
5	0,0 %	0,13 %	120 ppm	6,3	1,9 %	74 %	≤ 10 %	0 %	2 °C	0,0009 h ⁻¹	14,66 days	24,38 days	> 44 days	☐
4	0,0 %	0,13 %	120 ppm	6,3	1,9 %	74 %	≤ 10 %	0 %	5 °C	0,0036 h ⁻¹	3,5 days	5,83 days	23,25 days	☐
3	0,0 %	0,13 %	120 ppm	6,3	1,9 %	74 %	≤ 10 %	0 %	7 °C	0,007 h ⁻¹	1,79 days	3 days	11,92 days	☐
2	0,0 %	0,13 %	120 ppm	6,3	1,9 %	74 %	≤ 10 %	0 %	8 °C	0,0089 h ⁻¹	1,41 days	2,38 days	9,38 days	☐
1	0,0 %	0,13 %	120 ppm	6,3	1,9 %	74 %	≤ 10 %	0 %	12 °C	0,0172 h ⁻¹	0,73 days	1,25 days	4,88 days	☐

Generated: 31 August 2023 14:00:58

4.- Conclusiones:

52

1. Los modelos predictivos de crecimiento microbiano son recursos útiles para la investigación del cumplimiento legal de los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria. Así como, permiten ofrecer garantías complementarias en la aplicación de los sistemas de autocontrol y en la verificación de los peligros microbianos.
2. El principio de la aplicación de los modelos predictivos requiere una adecuada caracterización del producto y un conocimiento de las condiciones de conservación razonablemente previsibles.
3. Los modelos aportan una información científica basada en la caracterización de los productos, en la categorización del riesgo y en un procedimiento robusto de validación de la vida útil de los alimentos listos para el consumo.

4. Mediante el uso de modelos permite que el OEA pueda simular y reformular productos cárnicos e innovar mediante el diseño de nuevos productos cárnicos con amplias garantías de seguridad en toda la cadena alimentaria.
5. Las herramientas de simulación contribuyen a reducir la carga de trabajo experimental y los costes inherentes que son requeridos para determinar y evaluar la inocuidad en un producto cárnico. Su uso resulta especialmente relevante y aplicable en aquellas industrias cárnicas que disponen de una mediana o pequeña capacidad y por ende disponen de presupuestos más reducidos.
6. Así mismo, la simulación de crecimiento representa una herramienta eficaz para el control sanitario oficial encargado de la vigilancia y supervisión del funcionamiento de las industrias alimentaria. Permite evaluar las verificaciones de la vida útil que han sido ejecutadas por los OEAs en los productos cárnicos fabricados y comercializados a lo largo de su vida útil.

5.- Bibliografía:

- AESAN. (2020). *Uso de aditivos en productos cárnicos tradicionales curados*. Aprobado en la Comisión Institucional del 18/09/2020, AESAN, Comisión Institucional, Madrid. Obtenido de https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/interpretaciones/quimicas/Aditivos_productos_carnicos_tradicionales_curados.pdf
- Alapont Gutierrez, C., Simón Soriano, P. y Torrejón Lanero MJ. (2020). *Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos*. FEDACOVA, Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública, Valencia. Obtenido de Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. Valencia: https://www.icoval.org/images/todoguiasappcc/vida_util.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>)
- Bergis, H., Bonanno, L., Asséré, A., y Lombard, B. (2021). *EURL Lm Technical Guidance Document on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to Listeria monocytogenes*. European Union Reference Laboratory for Listeria monocytogenes. París: ANSES. Obtenido de https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-07/biosafety_fh_mc_tech-guide-doc_listeria-in-rte-foods_en_0.pdf
- Bover i Cid, S. y Garriga i Turón, M. (2014). *Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo. Informe final de la actividad (Ref. 0404-I3020)*. Monells (Girona): Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Obtenido de https://acsa.gencat.cat/web/.content/_Publicacions/Informes-tecnics/Informes_ACSA/informe_listeria_irta_2014_castella.pdf
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M. y Zurera, G. (2007). Survey of Temperature and Consumption Patterns of Fresh-Cut Leafy Green Salads: Risk Factors for Listeriosis. *Journal of Food Protection*, 70(10), 2407–2412. doi:10.4315/0362-028x-70.10.2407
- Casquete, R., Benito M., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E. y Córdoba M. G. (marzo-abril de 2012). Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. *Food Control*, 24, 191-198. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.026>
- Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. (2019). *Brote de listeriosis por consumo de productos fabricados por la empresa Magrudis S.L.* Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación, Madrid. Obtenido de <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeri>

osis/docs/20190920_Brote_de_listeriosis_asociado_al_consumo_de_carne_mechad
a.pdf

- Codex Alimentarius Commission. (2009). 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. Obtenido de https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B61-2007%252FCXG_061s.pdf
- Comisión Europea. (22 de diciembre de 2005). Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*(L 338), 1-26. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20200308>
- Conner D.E., Scott V.N. y Bernard D.T. (agosto de 1990). Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *Journal of Food protection*, 53(8), 652-655. doi:10.4315/0362-028X-53.8.652.
- EFSA. (2003). The effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety. *The EFSA Journal* (2003) 14, 1-31.
- Encinas, J., Sanz, J., García-López, M.L. y Otero A. (1999, febrero 2). Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *International Journal of Food Microbiology*, 46(2), 167-171. doi:10.1016/s0168-1605(98)00184-6
- 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
- Food Safety Authority of Ireland. (2017). Guidance nº 8: Determination of product shelf-life. Obtenido de https://www.fsai.ie/faq/shelf_life/determination.html
- Garre Pérez, A., Egea Larrosa, J.A. y Fernández Escámez P.S. (noviembre de 2016). Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *Anuario de Jóvenes Investigadores*, 9, 160-163. Obtenido de <https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/5909/mmd.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gunvig, A. B.-H. (2007). A predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in meat products with seven different hurdle variables. *5th International Conference Predictive Modelling in Foods ICPMF2007, Athens, Greece, 16-19 September 2007*, (págs. 197-201). Atenas. Obtenido de https://digicomst.ie/wp-content/uploads/2020/05/2009_06_10.pdf

- Gunvig, A., Borggaard, C., Hansen, F., Hansen, T.B. y Aabo, S. (septiembre de 2016). ConFerm - A tool to predict the reduction of pathogens during the production of fermented and matured sausages. *Food Control*, 67, 9-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.026>
- 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 nº 2, 324-330.
- Hew, C.M., Hajmeer, M.H., Farver, T.B., Glover, J.M. y Cliver, D.O. (2005, febrero). Survival of *Listeria monocytogenes* in experimental chorizos. *Journal of Food Protection*, 68(2), 324-330. doi:10.4315/0362-028x-68.2.324
- Hospital, X.F, Hierro, E. y Fernández, M. (2012, febrero 15). 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(3), 395-401. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.032
- Hwang C. y Shiohshuh 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. doi:10.1016/j.fm.2010.03.004
- Íñigo Nuñez S. y Jiménez Manso A. (2012). *Guía de estudios de vida útil para Listeria monocytogenes en alimentos listos para su consumo*. Comunidad de Madrid, Documentos técnicos de Higiene y Seguridad Alimentaria nº 6. . Madrid: Dirección General de Ordenación e Inspección. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Obtenido de <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017308.pdf>
- Íñigo Nuñez, S. y Jiménez Manso, A. (2012). *Guía de estudios de vida útil para Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo*. . Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid , Dirección General de Ordenación e Inspección. Madrid: Documentos Técnicos de Higiene y Seguridad Alimentaria nº 6. Obtenido de <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017308.pdf>
- Martin, B, Garriga, M. y Aymerich T. (mayo de 2011). Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at samall-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 74(5), 812-815. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-437
- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, K., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D. y Dalgaard, P. (julio de 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*, 141(3), 137-150. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.026
- Menéndez R.A., Rendueles E., Sanz J.J.,Capita R. y García-Fernández C. (octubre de 2015). Behavior of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products packaged

- unader vacuum or modified atmosphere conditions. *Journal of Food Protection* 78, 78(10), 1891-1895. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-103
- Menéndez, R.A, Rendueles, E., Sanz, J.J., Santos, J.A. y García-Fernandez C. (2018). Physicochemical and microbiological characteristics of diverse Spanish cured meat products. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 199-204. doi:<https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1379560>
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (14 de septiembre de 2007). Real Decreto 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se modifica el Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de pro. *BOE*(221), 37553-37544. Obtenido de <https://www.boe.es/boe/dias/2007/09/14/pdfs/A37533-37544.pdf>
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. (17 de marzo de 2015). Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligato. *BOE*(65), 24012-24015. Obtenido de <https://www.boe.es/boe/dias/2015/03/17/pdfs/BOE-A-2015-2837.pdf>
- Muñoz, A.I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G. y 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(3), 428-439. doi:<https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i3.394>
- Nolan D.A., Chamblin D.C. y Troller J.A. (agosto de 1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, 16(4), 323-335. doi:10.1016/0168-1605(92)90034-z
- OMSA. (2021). *Listeria monocytogenes*. En OMSA, *Manual terrestre de la OMSA* (pág. 19). Paris: Organización Mundial de Sanidad Animal. Obtenido de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.10.05_Listeria_monocytogenes.pdf
- Parlamento Europeo y Consejo. (1 de febrero de 2002). Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria... *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L(31), 1-24. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02002R0178-20220701&qid=1693421992497>
- Parlamento Europeo y Consejo. (22 de noviembre de 2011). Reglamento (UE) n° 1169/2011, del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.. *Diario Oficial de la Unión Europea*(304), 18-62. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&qid=1693420420034>

- Parlamento Europeo y del Consejo. (2008). Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L(354), 1-336. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R1333-20170612&from=EN>
- Pérez-Rodriguez, F., Carrasco, E., Bover-Cid, S., Jofré, A. y 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). doi:10.2903/sp.efsa.2017.EN-1252
- 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*. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Madrid: Comisión Institucional. AESAN. Obtenido de https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Verificacion_vida_util.pdf
- Ruiz-Ramirez, J., Serra, X., Arnau, J. y 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. (1 de junio de 2013). Utilization of mathematical models to manage risk of holding cold food without temperature control. *Journal of Food protection*, 76(6), 1085-1094. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-424
- Silva, R., Pereira, J., Rouxinol, M. y Patarata, L. (mayo de 2020). Sensory changes and Listeria monocytogenes behavior in sliced cured pork loins during extended storage. *Foods*, 9(5), 1-17. doi:10.3390/foods9050621
- Simpson C.A., Geornaras I., Yoon Y., Scanga J.A., Kendall P.A. y Sofos J.N. (2008, marzo). Effect of inoculum preparation procedure and storage time and temperature on the fate of Listeria monocytogenes on inoculated salami. *Journal of Food Protection*, 71(3), 494-501. doi:10.4315/0362-028x-71.3.494
- Sorrells, K.M., Enigl, D.C. y Hatfield, J.R. (1989, agosto). Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of Listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection*, 52(8), 571-573. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31003336/#:~:text=Greatest%20survival%20occurred%20at%2010,in%20HCl%20at%2028%20d>.
- Thévenot D., Dernburg A. y Vernozzy-Rozand C. (julio de 2006). An updated review of Listeria monocytogenes in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 7-17. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02962.x
- Tirado, J., Paredes, D., Velazquez, G. y Torres J.A. (2005). Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(1), 66-76. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/724/72450110.pdf>

- Tirloni, E., Di Pietro, V., Rizzi, G., Pomilio, F., Cattaneo, P., Bernardi, C. y Stella S. (2019, septiembre 30). Non-thermal inactivation of *Listeria* spp. in a typical dry-fermented sausage: "bergamasco" salami. *Italian Journal of Food Safety*, 8(3), 168-173. doi:10.4081/ijfs.2019.8112
- Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A. y Mercado, M. (junio de 2005). Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Rev.MVZ Cordoba*, 10(1), 511-543. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3298664>
- Wijtzes, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H. y Roberts T.A. (abril de 1993). Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 18(2), 139-149. doi:10.1016/0168-1605(93)90218-6
- Zwietering, M.H., Wijtzes, T., Rombouts, F.M y Van't Riet, K. (diciembre de 1993). A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. *Journal of Industrial Microbiology*, 55(12), 973-979. doi:10.4315/0362-028X-55.12.973