

Modelo matemático predictivo del crecimiento de *Escherichia coli* O157 en carne vacuna

SIGNORINI, M.L.^{1*}

Resumen

El objetivo del estudio fue modelar el crecimiento microbiano de *Escherichia coli* O157 en carne vacuna (hamburguesas) como parte de una evaluación cuantitativa de riesgos. Se seleccionaron artículos científicos que exponían de manera completa modelos predictivos de crecimiento del patógeno en carne en función de la temperatura y dos modelos predictivos terciarios. A partir de éstos se generaron datos sobre el tiempo de latencia (\ddot{e}) y tasa de crecimiento (μ) en un rango de temperaturas (5°C a 34°C) y pH (5,6 – 6,5), obteniéndose la relación lineal entre cada parámetro y temperatura. Se incluyeron las ecuaciones lineales en distribuciones de probabilidad para cada parámetro y se corrió un modelo para analizar el comportamiento de las ecuaciones lag-exponencial y Gompertz en la predicción del crecimiento de *E. coli* O157. La metodología expuesta permite incluir diferentes condiciones ambientales presentes en la carne a lo largo del proceso, considerando la variabilidad y las incertidumbres de los parámetros que caracterizan el crecimiento microbiano. Gompertz fue el modelo microbiológico que mejores resultados generó, ya que al considerar la concentración de bacterias que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, evita obtener valores extremadamente elevados.

Palabras clave: (Evaluación cuantitativa de riesgos), (*Escherichia coli* O157), (modelos de crecimiento)

Mathematical model to predict the growth of *Escherichia coli* O157 in beef

Summary

The aim of this study was modeled *Escherichia coli* O157 growth in beef hamburger as part of a quantitative risk assessment. Scientific articles that presented a complete pathogen growth model in meat depending on the temperature and two tertiary predictive models were selected. Since they were generated data of lag phase (\ddot{e}) and growth rate (μ) in a range of temperatures (5 ° C to 34 ° C) and pH (5.6 - 6.5), and were obtained the linear relationship between each parameter and temperature. Linear equations in probability distributions for each parameter were included and ran a model for analyzing the behavior of lag-exponential and Gompertz equations in predicting *E. coli* O157 growth. The methodology exposed allows including different environmental conditions present in the meat throughout

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Rafaela, Ruta 34 Km 227, Rafaela, C.P. 2300, Provincia de Santa Fe, Argentina. Teléfono: +54 3492 440121 interno 133, e-mail: marcelo.signorini@gmail.com
Recibido: 20/06/08 - Aceptado: 02/12/08

the process, taking into account the variability and uncertainty in the microbial growth parameters. Gompertz microbiological model generated better results, because consider the bacteria concentration on the stationary growth phase, preventing obtain extremely high values.

Key words: (Quantitative risk assessment), (*Escherichia coli* O157), (growth models)

Introducción

La contaminación bacteriana de la carne se puede producir en cualquier etapa de la cadena, desde la producción primaria hasta la preparación para su consumo final y de ahí la necesidad de analizar cada problemática con una visión integral del tipo «de la granja a la mesa»^{10; 18}.

Dentro de estos esquemas, el análisis de riesgos es un proceso estructurado y sistemático mediante el cual se examinan los posibles efectos nocivos para la salud como consecuencia de un peligro presente en un alimento, o de una propiedad de éste, y se establecen opciones para mitigarlos^{8; 14; 16}.

Realizar una evaluación de riesgos asociada a peligros microbiológicos resulta complejo por el potencial de las poblaciones bacterianas para crecer o disminuir en función del microambiente generado desde la producción hasta el consumo¹², lo cual obliga además a considerar las incertidumbres y variabilidad propias de dicho proceso biológico^{1, 14}.

Los modelos de crecimiento microbiano integrados a un modelo cuantitativo de riesgos tratan de representar el incremento en la población microbiana durante diferentes etapas del proceso (ej. procesamiento, distribución, almacenamiento, etc.). De esta forma, se debe modelar el fenómeno mediante el cual un número inicial de bacterias (N_i) se multiplica para dar como resultado un número final de microorganismos (N_f), debiendo considerar los factores que regulan y condicionan el crecimiento bacteriano (ej. pH, temperatura, actividad de agua, etc.).

Para lo anterior existen diferentes modelos que nos sirven como herramientas para modelar el crecimiento microbiano, pudiéndolos dividir en tres tipos: a) primarios (describen la evolución

de la población de microorganismos a lo largo del tiempo bajo determinadas condiciones que son asumidas como constantes), b) secundarios (tienen en consideración la variabilidad que puede ocurrir en el período bajo análisis en cuanto a sus condiciones ambientales) y c) terciarios (aplicaciones informáticas que calculan el desempeño microbiano bajo condiciones ambientales específicas).

Los tradicionales métodos predictivos de crecimiento microbiano no siempre logran ser de utilidad para su empleo en modelos cuantitativos de riesgos, ya que bajo este enfoque se requiere incorporar parámetros que modelen el crecimiento para una serie de tiempo y que contemplen la variabilidad e incertidumbre del proceso y no sean solamente puntos fijos estimados (enfoque determinístico). Los modelos microbiológicos predictivos no fueron desarrollados con estos propósitos, por lo que su empleo en modelos cuantitativos de riesgos debe ser cuidadoso¹³.

En evaluaciones cuantitativas de riesgos se necesita emplear una distribución de probabilidad que represente al N_i y predecir la distribución de probabilidad para el N_f bajo condiciones ambientales heterogéneas, por lo que se deben modelar los parámetros que caracterizan las ecuaciones de crecimiento microbiano (μ y δ) para introducir en ellos la variabilidad e incertidumbres del proceso.

En este trabajo se expondrá una metodología para modelar el crecimiento microbiano e incorporarlo en un modelo cuantitativo de riesgos (*Escherichia coli* O157 en hamburguesas). Se analizará la manera en que se puede considerar la variabilidad intrínseca del proceso así como representar las fuentes reconocidas de incertidumbre.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los modelos microbianos predictivos publicados, siendo los criterios de selección los siguientes: a) estar basados en el crecimiento de *E. coli* O157; b) debían modelar el crecimiento en función de la temperatura y c) su metodología debía hacer énfasis en carne cruda de bovino. Adicionalmente, se realizó una búsqueda de los modelos terciarios disponibles.

Dentro de los artículos científicos publicados, se seleccionaron los de Marks y col. (1998)¹² y Tamplin y col. (2005)¹⁷. El modelo microbiano predictivo expuesto en el primer artículo utilizó ecuaciones similares a las de Ratkowsky pero empleando el logaritmo natural como método de transformación para lograr relaciones más lineales entre la temperatura y los parámetros de crecimiento. Este modelo contempló variaciones en la temperatura ambiente. Las ecuaciones para los parámetros de crecimiento fueron las siguientes:

$$\ln(\mu) = 7,03 + (-6,31 \times \ln(\ln \text{Temperatura}))$$

$$\ln(\ddot{e}) = 9,98 + (-2,69 \times \ln(\text{Temperatura}))$$

Por su parte, la ecuación presentada por Tamplin y col. (2005)¹⁷ se caracterizó por medir el comportamiento del patógeno en carne de bovino cruda estéril a lo largo de un importante rango de temperaturas, que incluyó tanto temperaturas de crecimiento como de inactivación (5°C a 45°C). La ecuación propuesta para la tasa de crecimiento se basó en el modelo extendido de Ratkowsky, mientras que para la fase lag se empleó el modelo lognormal:

$$\sqrt{k} = b (T - T_{\min}) (1 - \exp(c(T - T_{\max})))$$

Donde: $b = 0,028$, $c = 0,7524$, $T_{\min} = 3,7942$;
 $T_{\max} = 47,1646$. $R^2 = 0,99$

$$\ddot{e} = a + b \exp [(-\ln(2)/\ln(e)^2) \ln((x - c) / (e^2 - 1) / (d e)) + 1]^2]$$

Donde: $a = -1,033$; $b = 14,957$; $c = 10,641$;
 $d = 6,376$; $e = 0,296$. $R^2 = 0,85$

Dentro de los modelos terciarios se destacó el Pathogen Modeling Program generado por el

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y que se puede obtener a partir de la siguiente página web: www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm. Este modelo es empleado para estimar el desarrollo de determinadas bacterias patógenas en función de diferentes factores ambientales intrínsecos y extrínsecos. En la versión 7.0 del programa, se empleó un modelo para el crecimiento de *E. coli* O157:H7 que derivó de datos obtenidos a partir de caldos de cultivos, lo cual presenta incertidumbre acerca de las predicciones generadas por este modelo cuando se lo emplea en diferentes matrices alimentarias como carne cruda. Este programa se basó en los modelos generados por Buchanan y Klawitter (1992)³, Buchanan y col. (1993)⁴, Buchanan y col. (1994)⁵ y Buchanan y Bagi (1997)⁶.

El software Growth Predictor fue diseñado por el Instituto de Investigaciones de Alimentos y por la Food Standards Agency (Agencia de Normas de Alimentos) de Gran Bretaña. Este programa ofrece modelos para predecir el crecimiento de organismos en función de factores ambientales incluida la temperatura, pH y actividad de agua y se basó en datos generados en varios laboratorios de Gran Bretaña. Para el caso específico de *E. coli* O157, empleó el modelo generado por Baranyi y Roberts (1994)².

Empleando las cuatro ecuaciones de crecimiento microbiano anteriormente descritas, se calcularon los parámetros que caracterizan a los modelos microbianos de crecimiento (μ y \ddot{e}) en un rango de temperaturas de 5°C a 34°C (con diferencia de 1°C entre los 5°C y los 10°C y cada 2°C entre 10°C y 34°C) y fijándose el pH de las simulaciones en tres diferentes niveles (5,6; 6,0 y 6,5) teniendo en cuenta el rango de valores normales que pueden encontrarse en la carne cruda.

Una vez obtenidos los valores para las diferentes combinaciones de factores en cada uno de los modelos, se procedió a establecer la relación lineal entre la temperatura y los valores estimados por los modelos empleados para cada parámetro, utilizándose el logaritmo natural como herramienta para realizar transformaciones. Se verificó el cumplimiento de los diferentes

supuestos de la relación lineal (linealidad, independencia y normalidad de los errores y homoscedasticidad) antes de emplearlas en modelos predictivos.

Con las ecuaciones lineales obtenidas se seleccionaron las distribuciones de probabilidad para μ y \ddot{e} , que reflejaran la variabilidad existente en cada parámetro. Para tal efecto se seleccionó la distribución normal, siendo, en cada una de las distribuciones de probabilidad, la media la ecuación lineal obtenida, mientras que la desviación estándar correspondió al error estándar de la función lineal.

Las distribuciones de probabilidad de los parámetros de crecimiento microbiano se incorporaron en dos modelos primarios de crecimiento, el modelo lag-exponencial y Gompertz, cuyas fórmulas son las siguientes:

$$\text{Lag exponencial: } y_{(t)} = \begin{cases} y_0; & t < \ddot{e} \\ y_0 + \mu (t - \ddot{e}); & t > \ddot{e} \end{cases}$$

Gompertz reparametrizada:

$$y_{(t)} = y_0 + (y_{\max} - y_0) \frac{\exp(-\exp(e^{-\mu} (\ddot{e} - t) + 1))}{(y_{\max} - y_0)}$$

Donde: y_0 = concentración inicial

y_t = concentración final al tiempo t

y_{\max} = concentración bacteriana máxima

Para evaluar cuál sería el comportamiento de los dos modelos en el marco de la evaluación cuantitativa de riesgos por *E. coli* O157 en hamburguesas, se generó un modelo hipotético (gráfico 1) para simular el crecimiento microbiano, en el cual la temperatura de almacenamiento de las hamburguesas siguiera una distribución triangular con parámetros temperatura mínima, más común y máxima de 4°C, 8°C y 12°C, respectivamente. El tiempo desde la producción de la hamburguesa hasta su consumo, también fue modelado teniendo como base el tiempo de consumo recomendado por los elaboradores, empleando una distribución uniforme con parámetros 0 días para el límite inferior y límite superior representado por una distribución normal

con media 10 días y desviación estándar 1 día. Para modelar la concentración inicial de bacterias en el producto, se empleó una distribución triangular con parámetros hipotéticos (ante la falta de datos previos del modelo cuantitativo de riesgos) de 1 célula por cada 100, 10 y 1 gramos como valor mínimo, más común y valor máximo, respectivamente; mientras que la concentración final se modeló mediante una distribución triangular con valores mínimos y máximos de 5 y 10 logUFC/g, mientras que el valor más probable se estableció como una distribución uniforme entre 5 y 10 logUFC/gramo, considerando los valores reportados por Powell y col. (2004)¹⁵ y Lebert y col. (2000)¹¹. Este trabajo se centró en encontrar la mejor opción para modelar el crecimiento microbiano dentro de una evaluación cuantitativa de riesgos de *E. coli* O157 por consumo de hamburguesas, por lo que las distribuciones de probabilidad para la temperatura de almacenamiento, tiempo hasta el consumo, concentración inicial y final de microorganismos y sus correspondientes parámetros, son solamente hipotéticos y no se pretende realizar en este trabajo un análisis profundo de los mismos.

Para la construcción del modelo cuantitativo de riesgos, los datos se integraron en el programa @Risk versión 4.5 (Palisade, Newfield, NY), empleándose para los muestreos la metodología del Hipercubo Latino. Se corrieron 1.000 iteraciones para cada uno de los modelos y se compararon los resultados generados, seleccionándose para el modelo cuantitativo de riesgos el que mejores características presentara.

Resultados

Inicialmente se calculó, para cada uno de los modelos utilizados, el valor correspondiente para la fase lag (\ddot{e}) en función de la temperatura ambiente y el pH, obteniéndose en total 126 datos, los cuales fueron analizados para generar la relación lineal entre ambas variables. En el gráfico 2a se puede observar la relación lineal obtenida, cuya ecuación es la siguiente:

$$\ln(\ddot{e}) = 10,169 + (-2,768 \times (\ln(\text{temp})))$$

error estándar = 0,147 $R^2 = 0,989$

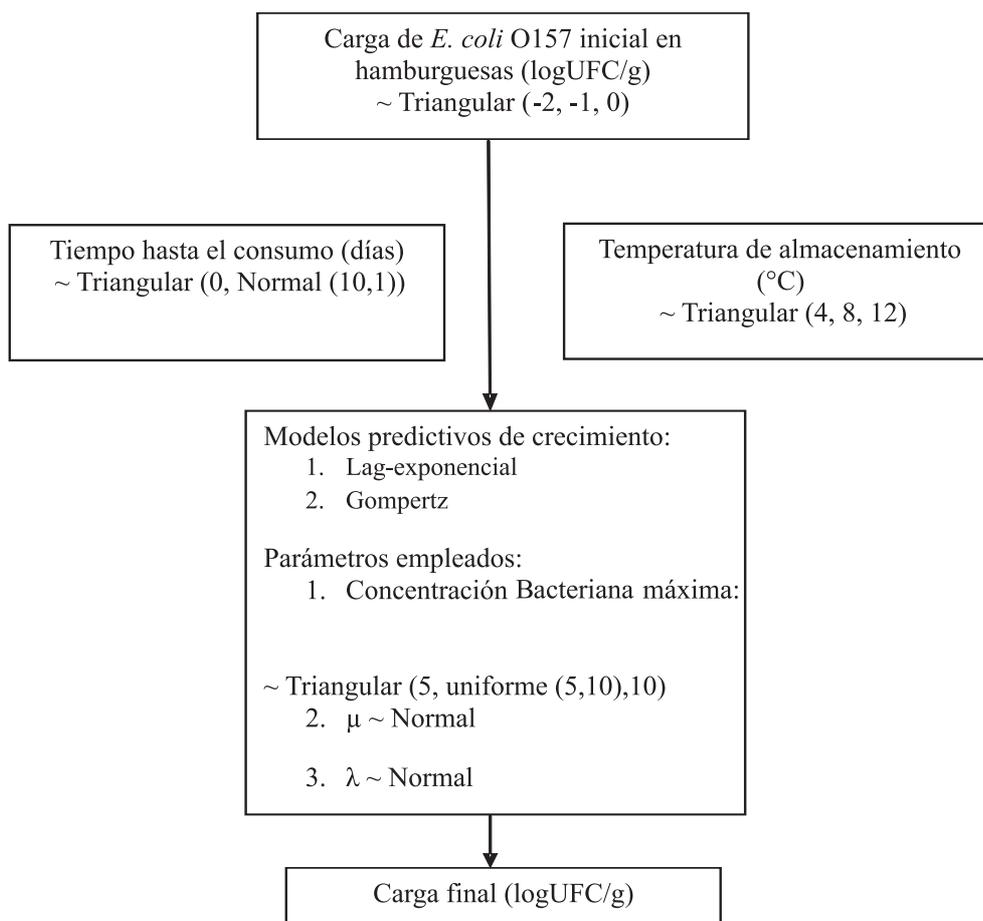


Gráfico 1

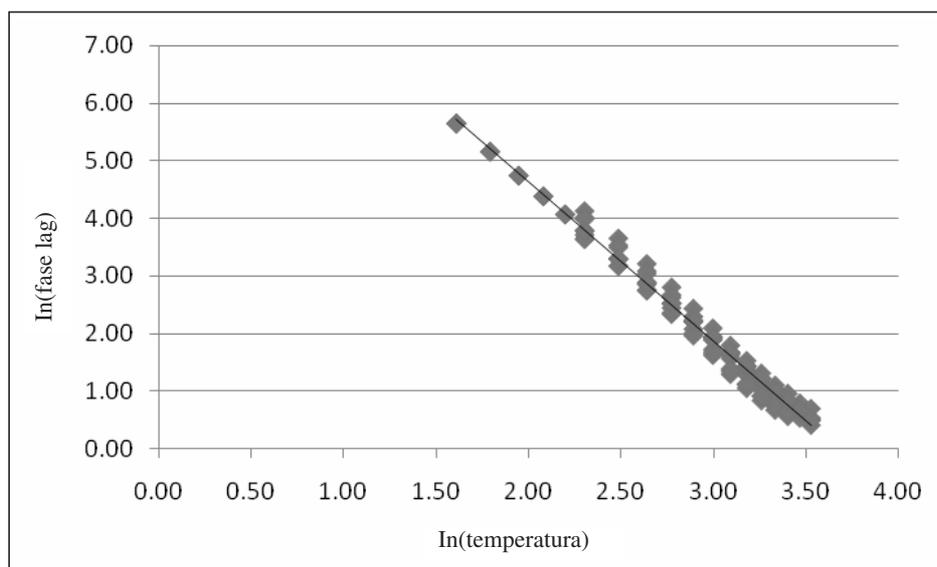


Gráfico 2 a

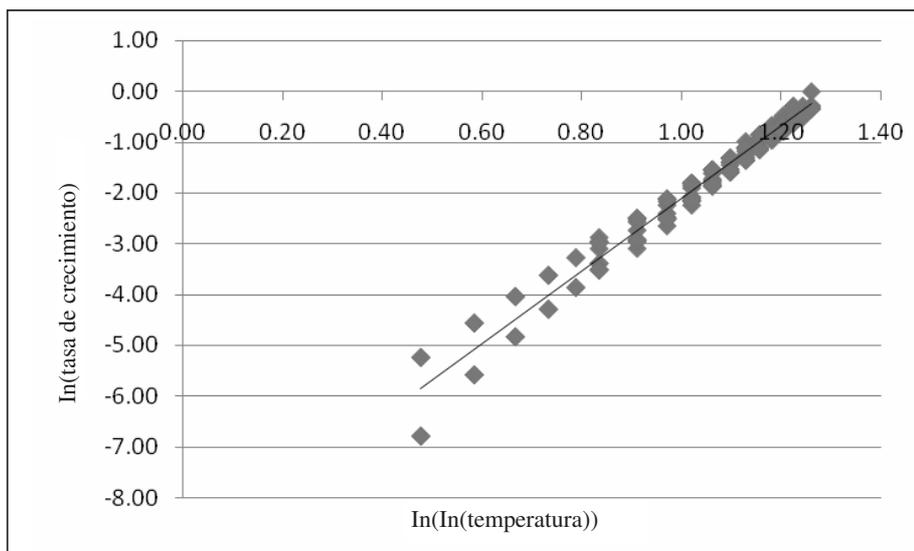


Gráfico 2 b. Puntos observados y recta de regresión lineal.

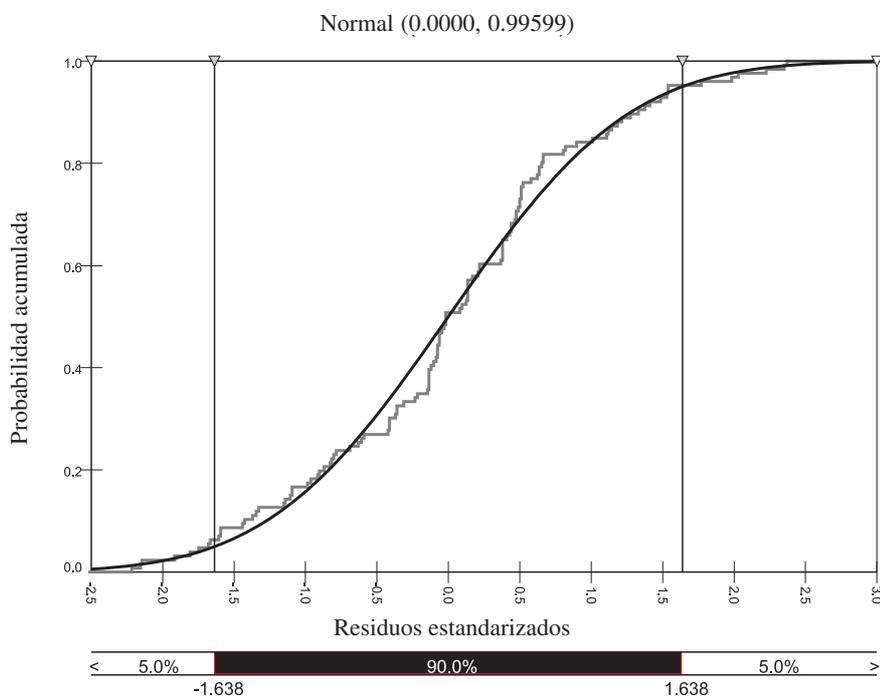


Gráfico 3 a.

El coeficiente de regresión es cercano a 1 lo que indica que el modelo de regresión lineal explica gran parte de la variabilidad del $\ln(\ddot{\epsilon})$ en función de los cambios en el logaritmo natural de la temperatura. Cuando se pretende utilizar una ecuación de regresión lineal con fines predictivos, es fundamental corroborar que se cumplan los supuestos de la regresión lineal. En este caso, los residuos estandarizados presentaron una media de $2,96 \cdot 10^{-14}$ y una desviación estándar de 0,996, evidenciando una distribución normal de los valores, lo cual puede observarse en el gráfico 3a, donde se compara la distribución acumulada de los residuos estandarizados del modelo lineal con una distribución normal ajustada. Los residuos estandarizados se distribuyen sin ningún tipo de patrón a lo largo de la curva normal ajustada. Lo anterior se ratificó estadísticamente al realizar la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,234$) para comprobar la normalidad de los residuos estandarizados.

Para la estimación del parámetro μ se generaron los valores esperados empleando los cuatro modelos predictivos seleccionados en función de cambios en la temperatura ambiente. Para lograr linealizar la relación se transformó la variable μ mediante el logaritmo natural, mientras que para el caso de la temperatura se procedió a obtener el logaritmo natural del logaritmo natural de la misma. La ecuación de regresión lineal obtenida fue la siguiente:

$$\ln(\mu) = -9,258 + (7,155 \times (\ln(\ln(\text{temp}))))$$

error estándar = 0,25 $R^2 = 0,972$

Al igual que en el caso anterior, la relación lineal explica la mayor parte de la variabilidad existente entre las dos variables analizadas al observar su coeficiente de regresión. En el gráfico 2b se observa que en la región de los valores más pequeños de $\ln(\ln(\text{temperatura}))$, los datos observados se dispersan más de la recta de regresión lineal que a mayores valores. Cuando se analizó la distribución de los residuos estandarizados, no se observó la presencia de *outliers* ni de puntos palanca, estando los

residuos dentro de un rango no mayor a 2 desviaciones estándar de la media y reunidos sin seguir un patrón determinado a lo largo de la variable independiente. Tanto la prueba de distancias de Cook como el valor centrado de palanca, no permiten identificar puntos extremos en la distribución de residuos.

Para este parámetro, los residuos estandarizados presentaron una media de $-1,19 \cdot 10^{-14}$ y una desviación estándar de 0,997, evidenciando una distribución normal de los valores, lo cual se observa en el gráfico 3b, donde se compara la distribución acumulada de los residuos estandarizados del modelo lineal con una distribución normal ajustada. Lo anterior se ratifica estadísticamente al realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,458$) para comprobar la normalidad de los residuos estandarizados.

Obtenidas las ecuaciones de regresión lineal que estiman los parámetros necesarios para modelar el crecimiento de *E. coli* O157 en función de la temperatura ambiente y habiendo comprobado los supuestos de la regresión lineal, se emplearon dichas ecuaciones en un modelo cuantitativo de riesgos hipotético. Considerando que los residuos de ambas ecuaciones se distribuyen de manera normal con media aproximada a 0 y desviación estándar constante cercana a 1, es posible utilizarlos para fines de inferencia estadística empleando para cada parámetro una distribución normal, tal como se describió en el apartado de materiales y métodos:

$$\ln(\ddot{\epsilon}) \sim \text{Normal}(10,169 + (-2,768 \times (\ln(\text{temp}))); 0,147)$$

$$\ln(\mu) \sim \text{Normal}(-9,258 + (7,155 \times (\ln(\ln(\text{temp}))))); 0,25)$$

Estas distribuciones de probabilidad reemplazaron los parámetros μ y $\ddot{\epsilon}$ en los modelos lag-exponencial y el modelo de Gompertz. Finalmente, se corrieron las 1.000 iteraciones del modelo cuantitativo de riesgos construido para analizar cómo se comportan los dos modelos elegidos para representar el

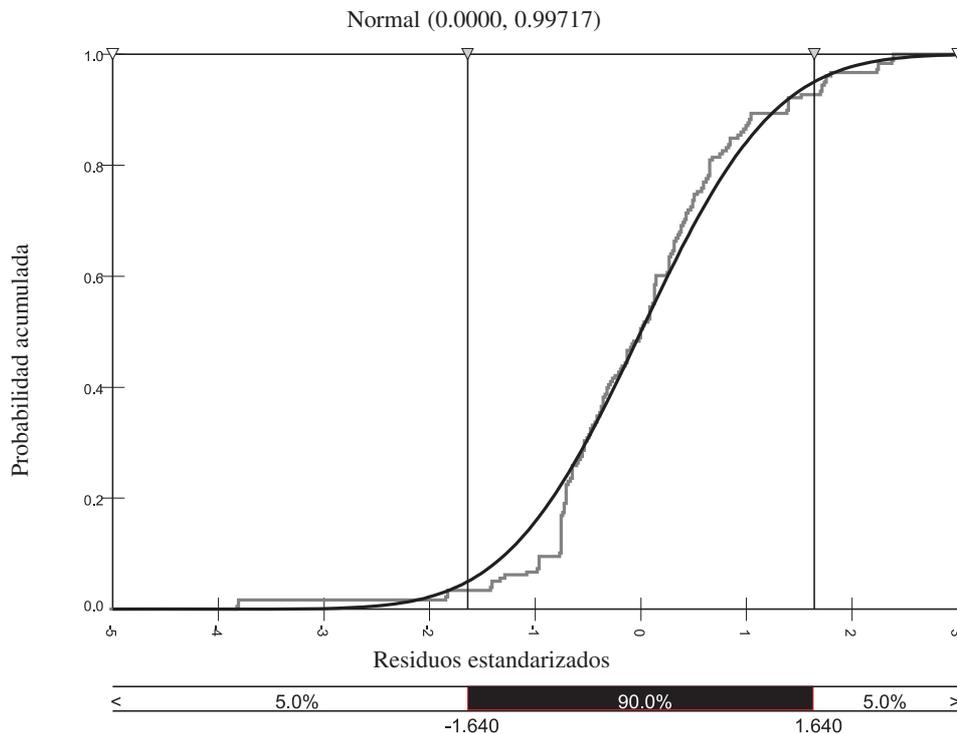


Gráfico 3 b. Datos observados (gris) y ajuste de la distribución normal (negro).

crecimiento de *E. coli* O157 en hamburguesas antes de su consumo.

Ambos modelos microbiológicos predictivos generan distribuciones similares para la concentración final de *E. coli* O157 en hamburguesas (gráfico 4), siendo la media para el modelo lag-exponencial de 0,56 logUFC/g, mientras que para el modelo Gompertz este valor es de 0,87 logUFC/g. El intervalo de confianza (IC=95%) para el modelo lag-exponencial presenta un mayor rango de valores, con límites inferior y superior de -2,68 logUFC/g y 8,12 logUFC/g, respectivamente; mientras que para el modelo Gompertz esos valores fueron de -1,34 y 6,26 logUFC/g, respectivamente. Lo anterior se debe a que el modelo lag-exponencial no toma en consideración la concentración máxima de bacterias que alcanzan en la fase estacionaria de crecimiento, aspecto que sí es incorporado en el modelo Gompertz.

Discusión

Las evaluaciones cuantitativas de riesgos presentan grandes desafíos a la hora de modelar el crecimiento microbiano, debido a la gran cantidad de factores que intervienen en dicho proceso (naturaleza de la matriz alimentaria, temperatura, duración del almacenamiento y características intrínsecas de cada microorganismo en particular) y a las formas existentes de modelar el desarrollo microbiano. De esta forma, en un modelo de evaluación de riesgos se deben considerar tanto la variabilidad como la incertidumbre asociada a los parámetros que definen las ecuaciones de crecimiento microbiano. En este contexto, la incertidumbre representa la falta de conocimiento sobre el valor de un parámetro, la cual puede reducirse si se realizan mediciones posteriores. Por su parte, la variabilidad representa la verdadera heterogeneidad de la

población como consecuencia de su naturaleza biológica, la cual es irreductible empleando mediciones adicionales. En este marco, la incertidumbre puede ser resultado de mediciones imprecisas o falta de conocimiento de los efectos o condiciones que no están consideradas en el modelo, mientras que la variabilidad puede ser el resultado de cambios en la temperatura, diferencias entre cepas de una misma bacteria u otras fuentes de variabilidad biológica

Cassin y col. (1998)⁷ en su evaluación de riesgos de *E. coli* O157 en hamburguesas, emplearon un modelo de Gompertz modificado, obteniendo las estimaciones de los parámetros μ y δ en función de la temperatura aplicando regresión lineal a los datos obtenidos a partir del programa Food MicroModel (Food MicroModel Ltd., Surrey, UK) empleando temperaturas de almacenamiento entre 10°C y 15°C y un rango de pH entre 5,1 y 6,1. A diferencia del modelo presentado en este trabajo, consideraron que no existía crecimiento microbiano a temperaturas por debajo de 7,7°C;

asumiendo que esta consideración presentaba incertidumbres importantes. Si bien a temperaturas menores a los 10°C la fase de latencia es muy prolongada, algunos estudios¹⁷ reportan crecimiento de *E. coli* O157 a temperaturas de refrigeración (6°C - 8°C). Esto no puede asumirse como inexistente en las evaluaciones cuantitativas de riesgos de productos como éste que es almacenado a temperaturas de refrigeración desde su producción hasta momentos antes a su consumo.

En el estudio realizado por la Food Safety and Inspection Service de los Estados Unidos (2001)⁹ sobre *E. coli* O157 en hamburguesas, predijeron el valor de los parámetros μ , δ y concentración máxima esperada en la fase estacionaria de crecimiento, a partir de dos estudios publicados y un modelo terciario, analizando la información a tres temperaturas de almacenamiento (12°C, 20°C y 35°C) y dos valores de pH (5,7 y 6,3). Luego de establecer la relación lineal entre los parámetros y la temperatura ambiente, incorporaron las

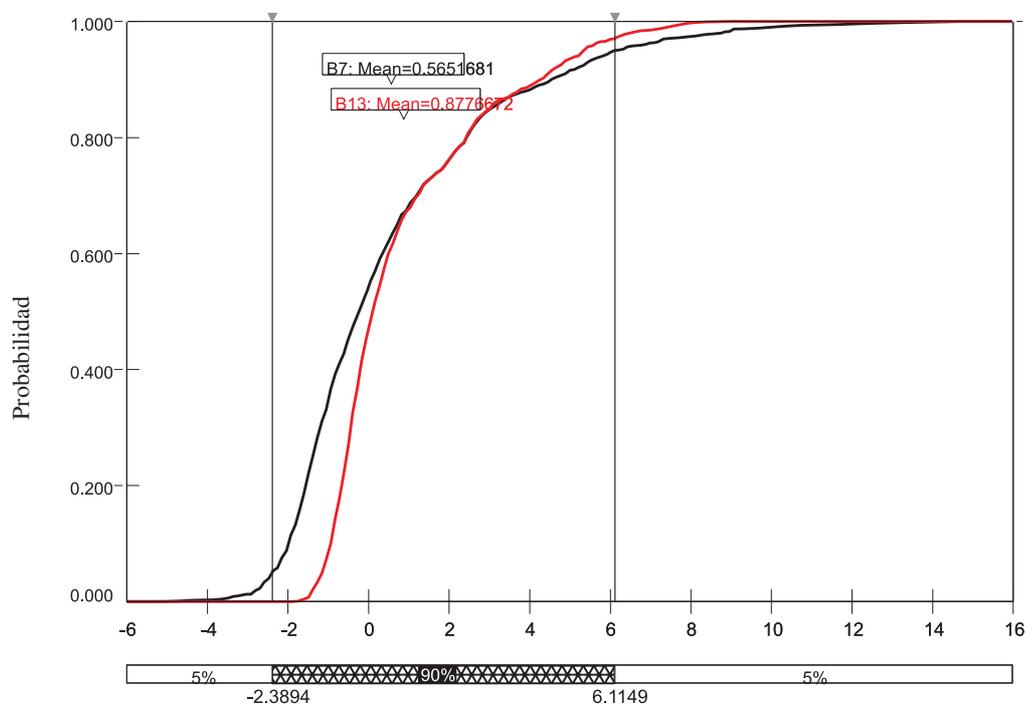


Gráfico 4. Modelo Gompertz (gris), modelo lag-exponencial (negro)

ecuaciones en distribuciones de probabilidad, de modo similar al realizado en este estudio.

Nauta y col. (2001)¹³ utilizaron el Pathogen Modelling Program para generar el modelo de crecimiento de *E. coli* O157 en tartas de carne, estimando el tiempo de generación y la duración de la fase de latencia como función de la temperatura y bajo las condiciones normales del producto alimenticio. Finalmente, las ecuaciones obtenidas fueron introducidas a un modelo lag-exponencial para obtener el número de bacterias al final del proceso.

Si bien no existe uniformidad en los estudios científicos publicados sobre qué modelo microbiológico predictivo emplear en las evaluaciones cuantitativas de riesgos, tanto el modelo lag-exponencial como Gompertz se han mostrado útiles para tal fin. No obstante, a partir de los resultados obtenidos en este estudio, resultaría más apropiado emplear el modelo Gompertz ya que considera la concentración de bacterias que alcanza la fase estacionaria de crecimiento. Si bien empleando ambos modelos se pueden obtener resultados similares, con el modelo Gompertz se evitaría la generación de valores de concentración final de microorganismos extremadamente elevados como sí son posibles observar en el gráfico 4 si se emplea el modelo lag-exponencial.

Antes de incorporar modelos de crecimiento microbiano en evaluaciones cuantitativas de riesgos se debe considerar la validez de las investigaciones, ya que no todos los modelos de crecimiento microbiano están validados bajo condiciones reales, por lo que resultaría incorrecto suponer que las predicciones del modelo son correctas si los puntos estimados son reemplazados por distribuciones de probabilidad en los parámetros que constituyen las variables de entrada del modelo¹⁴.

Conclusiones

En el presente estudio se expone la metodología empleada para obtener las funciones de probabilidad que se emplearán en una evaluación cuantitativa de riesgos de *E. coli* O157 en hamburguesas en Argentina. La metodología

permite considerar diferentes condiciones ambientales presentes en la carne a lo largo de la cadena agroalimentaria, incorporando de esa manera la variabilidad existente en el proceso y atendiendo a las incertidumbres identificadas. El modelo empleado considera un amplio rango de temperaturas y pH, respondiendo a las condiciones normales de almacenamiento bajo refrigeración de este tipo de productos. El modelo predictivo microbiológico que mejores resultados generó es el de Gompertz, el cual, al incorporar como parámetro la concentración de bacterias que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, produce resultados biológicamente razonables.

Bibliografía

1. Anderson, E.L.; Hattis, D. 1999. Uncertainty and variability. *Risk Analysis*, 19(1):47-49.
2. Baranyi, J.; Roberts, T.A. 1994: A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 277-294.
3. Buchanan, R.L.; Klawitter, L.A. 1992. The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 9:185-196.
4. Buchanan, R.L.; Bagi, L.K.; Goins, R.V.; Phillips, J.R. 1993. Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 10:303-315.
5. Buchanan, R.L.; Bagi, L.K. 1994. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Int. J. Food Microbiol.*, 23:317-332.
6. Buchanan, R.L.; Bagi, L.K. 1997. Effect of water activity and humectants identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 14:413-423.
7. Cassin, M.H.; Lammerding, A.M.; Todd, E.C.D.; Ross, W.; McColl, R.S. 1998. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *International J. Food Microbiol.*, 41:21-44.
8. FAO. 2004. Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos. Directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición*. Ed. FAO, Roma (Italia) pp. 93.

9. *Food Safety and Inspection Service. 2001. Draft risk assessment of the public health impact of Escherichia coli O157:H7 in ground beef. US Department of Agriculture, Washington, DC.*
10. Hoornstra, E.; Notermans, S. 2001. Quantitative microbiological risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.*, 66:21-29.
11. Lebert, I.; Robles-Olvera, V.; Lebert, A. 2000. Growth of mixed cultures of *Listeria* and *Pseudomonas* spp. in beef meat and their prediction using polynomial models. *46th ICoMST*, pp 700-701.
12. Marks, H.M.; Coleman, M.E.; Lin, C.T.J.; Roberts, T. 1998. Topics in microbial risk assessment: Dynamic flow tree process. *Risk Analysis*, 18(3):309-328.
13. Nauta, M.J.; Evers, E.G.; Takumi, K.; Havelaar, A.H.. 2001. Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands. *RIVM report 257851003 / 2001*.
14. Nauta, M.J. 2002. Modelling bacteria growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible?. *Int. J. Food Microbiol.*, 73:297-304.
15. Powell, M.; Schlosser, W.; Ebel, E. 2004. Considering the complexity of microbial community dynamics in food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.*, 90:171-179.
16. Strachan, N.J.C.; Dunn, G.M.; Ogden, I.D. 2002. Quantitative risk assessment of human infection from *Escherichia coli* O157 associated with recreational use of animal pasture. *Int. J. Food Microbiol.*, 75:39-51.
17. Tamplin, M.L.; Paolib, G.; Marmora, B.S.; Phillips, J. 2005. Models of the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in raw sterile ground beef stored at 5 to 46 °C. *Int. J. Food Microbiol.*, 100:335-344.
18. Van Gerwen, S.J.C.; Giffel, T.C.; Van't Riet, K.; Beumer, R.R.; Zwieterin, M.H. 2000. Stepwise quantitative risk assessment as a tool for characterization of microbiological food safety. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 938-951.

