

Modelado predictivo de *Escherichia Coli* O157:H7 en alimentos.

Redondo Alejandra, Torres Elvira¹, Sánchez Juan David²

Resumen

Introducción: *Escherichia coli* O157:H7 es un patógeno asociado diarrea inespecífica, diarrea sanguinolenta, Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA), responsable de complicaciones intestinales, sistémicas y otra serie de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). **Metodología:** Su identificación se realiza mediante pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares. Se encuentra distribuido en diversos países industrializados a nivel mundial, donde se han llevado a cabo estudios previos sobre su identificación en heces, agua y alimentos. La transmisión se produce principalmente a través de agua contaminada y otros alimentos como la carne picada, vegetales, leche cruda y fruta. Aplicar modelos predictivos resulta una manera adecuada para predecir el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en diferentes matrices alimentarias, permitiendo tomar medidas para controlar su desarrollo y reducir su incidencia como causante de ETA. Ejemplos de modelos predictivos de otros países son el propuesto por el Departamento de Agricultura de los estados Unidos (USDA), MicroHibro de la Universidad de Córdoba (España) y @Risk® (USA). En Colombia, no se han desarrollado modelos predictivos para describir el comportamiento de *E. coli* O157: H7 en los alimentos, pero si se ha empleado el software Pathogen Modelig Program (PMP) Versión 6.0 de USDA con el Eastern Regional Reseach Center

(ERRC) en la descripción de *E. coli* sp. a diferentes temperaturas. **Conclusiones:** Este texto busca mostrar una perspectiva a las aplicaciones informáticas que faciliten el modelado predictivo de *E. coli* O157:H7 en alimentos, su importancia y la aplicabilidad los mismos.

Palabras clave: Modelos Predictivos, Patógeno, Carne, ETA, O157:H7

Abstract

O157:H7 is a pathogen associated with nonspecific diarrhea, bloody diarrhea, Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) and Acute Diarrheal Disease (ADD), responsible for intestinal systemic complications and another series of Foodborne Diseases (FBD). *E. coli* O157:H7 identification includes biochemical, serological and molecular tests. It is distributed in several industrialized countries worldwide, where previous studies on its identification in feces, water and foods have been carried out. Transmission occurs mainly through contaminated water and other foods such as minced meat, vegetables, raw milk and fruit. Predictive models are therefore a suitable way to predict the behavior of *E. coli* O157:H7 in different food matrices, allowing measures to control its development and reduce its incidence as a cause of FBD. Examples of predictive models from other countries are the proposed by the United States Department of Agriculture (USDA), MicroHibro of the University

1 Estudiantes Programa de Microbiología de la Universidad Libre. Barranquilla. alejandraelenaredrocha@hotmail.com- elvi0910@hotmail.com

2 Profesor Asociado Programa de Microbiología de la Universidad Libre. Barranquilla.

of Córdoba (Spain) and @ Risk® (USA). In Colombia, no predictive models have been developed to describe *E. coli* O157: H7 behavior inside food, but if USDA's Pathogen Modelling program (PMP) Version 6.0 software in conjunction with the Eastern Regional Research Center (ERRC) has been used in the description of *E. coli* at different temperatures. This text seeks to show a computer applications perspective that facilitate *E. coli* O157: H7 predictive modeling in food, its importance and its applicability.

Keywords: Predictive Models, Pathogen, Meat, FBD, O157:H7

Introducción

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) se definen como un conjunto de síntomas originados por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población(1-4). Éstas constituyen un problema de salud pública mundial que aumenta con el pasar de los años. Entre los factores responsables se destacan el crecimiento de la población, la pobreza, la urbanización en los países subdesarrollados, el comercio internacional de alimentos y la aparición de nuevos agentes causantes de ETA o nuevas variantes de estos agentes con mayor resistencia y patogenicidad(5,6).

Las ETA se clasifican en intoxicaciones, toxiinfecciones e infecciones. Las intoxicaciones, se producen por la ingestión de toxinas o venenos que se encuentran presentes en el alimento ingerido, y que han sido producidas por hongos o bacterias, aunque éstos ya no se hallen en el alimento; las toxiinfecciones se producen al ingerir un microorganismo que dentro del cuerpo produce la toxina; y las infecciones,

se producen por la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales para la salud, que en la luz intestinal puedan multiplicarse o lisarse alcanzando otros sistemas, y cuyo factor de virulencia es diferente a una exotoxina(7). Macroorganismos causantes de ETA para destacar son *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter* spp., *Clostridium botulinum*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* serotipo O157:H71. Este último patógeno, perteneciente al patotipo de las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC), probablemente el grupo más virulento de las *E. coli* diarreogénicas debido a las dos verotoxinas (denominada así ya que se les descubrió por primera vez en las células Vero, cuyo origen es del riñón del mono verde africano *Chlorocebus*)8 o toxinas similares a las de *Shigella*, por lo que también es llamada *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) o *Escherichia coli* productora de toxinas tipo Shiga (STEC).

E. coli O157:H7 se caracteriza por ser un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, catalasa positivo oxidasa negativo, no fermenta el sorbitol, ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*9. La determinación del grupo patógeno al que este microorganismo pertenece se realiza utilizando un esquema de serotipificación desarrollado por Kauffman, éste tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno «O» es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (10).

E. coli O157:H7, se asocia con diversas enfermedades cuyo espectro clínico en seres humanos incluye diarrea inespecí-

fica, Diarrea Sanguinolenta (DS), Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)(6).

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle los síntomas, ya que la citotoxina Stx es el principal mecanismo de patogenicidad de STEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago Stx, que está insertado en el genoma. Una vez que la toxina Stx (subunidad B) se ha fijado a su receptor Gb3, es endocitada la subunidad A, transportada al aparato de Golgi y posteriormente hasta el retículo endoplásmico rugoso, para inhibir luego la síntesis proteica. La StxA, en ambas toxinas shiga, son N-glucosidasa altamente selectivas, que depurinan un residuo específico de adenina de la subunidad ribosomal 60S de la célula eucariótica, esto bloquea la síntesis de proteína y conduce a la muerte celular de las células intestinales o renales del hospedero(9). En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes Stx1 y Stx2 que son inmunológicamente diferentes. Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gen cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos. Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina (10,11).

Este microorganismo es el serotipo más reconocido en este grupo y es considerado como un patógeno de gran impacto en la salud pública, ya que ha sido identificado como una cepa causante de ETA a nivel mundial. Su transmisión se lleva a cabo por vía fecal-oral(12) y la fuente de contaminación de los alimentos son las heces humanas y de animales. La epide-

miología de cada variedad es diferente según el reservorio de la infección, niveles de sanidad e higiene en la comunidad y sistemas de producción agrícola y de los alimentos (13).

Actualmente se reconoce la existencia de distintas fuentes y vías de transmisión. Los rumiantes, y en particular el ganado bovino, son el principal reservorio y datos obtenidos durante los brotes y las infecciones esporádicas indican que la fuente más frecuente de toxiinfección por *E. coli* O157:H7 son los alimentos de origen bovino, especialmente la carne de vacuno poco cocida y los productos cárnicos de vacuno(13-17). La contaminación se produce como resultado de malas prácticas de faenado de los animales, su manipulación y la higiene de los mataderos(13). La segunda causa más importante por la cual se propaga esta patología es la ingesta de vegetales crudos(18,19), contaminación que se produce al ser *E. coli* O157:H7 liberada por los animales y los seres humanos en sus heces he ingresar a los agroecosistemas a través del estiércol, aguas de riego, semillas contaminadas, plagas de insectos y animales silvestres, o vectores nematodos(13). Entre otras matrices alimentarias relacionadas con la transmisión de este microorganismo se encuentran la sidra fresca no pasteurizada y la leche cruda y sus derivados como el queso fresco y el yogurt (20- 23).

El análisis retrospectivo de los alimentos relacionados con brotes causados por este serotipo ha revelado que menos de 10 UFC/g o ml pueden ser suficientes para causar la enfermedad. Dosis infectivas bajas, de 2 a 2000 UFC, han sido asociadas con brotes (22,24).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), un número creciente de brotes se asocian al consumo de estos ali-

mentos contaminados durante su cultivo, manipulación o 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”(19-26). También se ha aislado en masas de agua (estanques, arroyos), pozos y abrevaderos, y se ha observado que puede sobrevivir durante meses en el estiércol y en los sedimentos de recipientes de agua. Se ha informado de casos de transmisión por el agua, tanto por agua de bebida contaminada como por aguas de recreo(19,27,28).

La principal etiología del SUH es la toxiinfección gastrointestinal por cepas de *Escherichia coli* O157:H7, que da origen a un cuadro diarréico prodrómico (SUH-D+), generalmente de características hemorrágicas o disintéricas. La incidencia de este síndrome a nivel global se estimó en (2,1) casos cada 100.000 personas por año. En Latinoamérica, existen zonas endémicas como Argentina, que presenta el registro más alto de SUH, con aproximadamente 420 casos nuevos declarados anualmente(28-30), esto posiblemente debido a la elevada frecuencia de enfermedades diarreicas agudas producidas por toxinas tipo Shiga en este país. Aunque actualmente se conoce que puede aparecer en cualquier lugar del mundo y que su frecuencia está aumentando; en Colombia, en la ciudad de Bogotá, durante el período de junio 1992 a junio 2002, se demostró mediante la realización de un estudio a 63 pacientes con diagnóstico de SUH que entre los microorganismos causantes de la enfermedad sólo el 9,5% de los niños la desarrolló por *E. coli*, sin identificar el serotipo al que pertenecía (31). Debido a la severidad del SUH y la carencia de un tratamiento específico, la prevención primaria de toxiinfecciones por *E. coli* O157:H7 es fundamental para disminuir su impacto sanitario.

Las estrategias de control de los riesgos asociados a *E. coli* O157:H7 se pueden aplicar en diferentes etapas de la cadena alimentaria y su efectividad dependerá del conocimiento que se tenga sobre el impacto que cada etapa posee sobre la probabilidad de aparición de la toxiinfección (32).

Con respecto a la etiología bacteriana de la EDA, *E. coli* O157:H7 es uno de los principales que se aíslan en los cultivos de heces de personas con esta patología. En Colombia no se tenían informes de la presencia de este patógeno, sin embargo, en 1996, se reportó por primera vez, aunque con probabilidad de ser un caso no endémico, lo que indica la importancia de resaltar su intervención y estudio como agente causal de la EDA en el país como patógeno emergente (33).

Según lo reportado por el Instituto Nacional de Salud (INS) en el 2016, la tasa de mortalidad nacional de EDA es de 26,3 casos por 1.000.000 de menores de cinco años y la incidencia es de 59,1 casos por 1.000 habitantes, en donde las entidades territoriales con incidencia mayor a la nacional son Bogotá, Valle del Cauca, Quindío, Amazonas, Risaralda, Meta, Antioquia y Barranquilla (34).

La comprensión de los riesgos de las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos depende del conocimiento de las condiciones ambientales específicas que afectan el comportamiento de los patógenos (es decir, el crecimiento, la supervivencia y la disminución). Esta información puede traducirse en modelos matemáticos que permitan estimar cómo los patógenos específicos reaccionarán a condiciones ambientales únicas (35).

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 consumo, lo cual obliga además a considerar las incertidumbres, es decir, la falta de conocimiento sobre una propiedad medible de un sistema (un ejemplo es el momento en que alimento contaminado entra en la línea de procesamiento ya que se desconoce con qué frecuencia un lote de alimento contaminado ingresa a la fábrica) y variabilidad propias de dicho proceso biológico (36).

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.) (18).

Para lo anterior existen diferentes modelos que 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 (37).

A nivel mundial, en países como Argentina y España los estudios para el modelado predictivo de *E. coli* O157:H7 se desarro-

llan más que todo en carne vacuna y en derivados cárnicos (ej. hamburguesas, jamón), aunque también se han realizado en productos vegetales (ej. lechuga). Los tipos de modelo que se emplean para estos estudios son en su mayoría modelos primarios: de transferencia, modelos de crecimiento e inactivación(38), siendo el último el tipo de modelo que estudia la muerte de los microorganismos bajo condiciones especiales o la inactivación de estos o de sus toxinas (39).

Actualmente, con el fin de facilitar el modelado predictivo de microorganismos patógenos en diferentes matrices alimentarias, en otros países se han desarrollado software como los que ofrece el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA)40, MicroHibro desarrollado por el equipo de investigación HIBRO de la Universidad de Córdoba (España)(41) y otros que aplican para diferentes áreas como @Risk® desarrollado por Palisade Corporation, New York, Estados Unidos de América(42). En Colombia, no se han desarrollado herramientas informáticas conocidas para dicho fin, de igual manera, no se han encontrado referencias bibliográficas en las que se evalúe el crecimiento de *E. coli* O157:H7 utilizando programas de modelado predictivo de otros países. Sin embargo, estas herramientas informáticas si han sido utilizadas por investigadores como los de la Universidad de la Sabana, Bogotá, quienes utilizan el software, Pathogen Modeling Program (PMP) versión 6.0, que ofrece el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), para describir el crecimiento de *E. coli* sp. a diferentes temperaturas (43).

Debido a la presencia de éste patógeno en el país y a la mortalidad de las manifestaciones clínicas que puede desarrollar, resulta importante tener un mayor conocimiento del comportamiento de este patógeno

en alimentos para lograr un mejor control en la mitigación de su impacto como productor de ETA, por tanto, nos planteamos como objetivo describir las aplicaciones informáticas que faciliten el modelado predictivo de *E. coli* O157:H7 en alimentos, su importancia y la aplicabilidad los mismos.

Aislamiento De *E. Coli* O157:H7

Para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 se emplea el agar MacConkey sorbitol, medio en el cual es reemplazada la lactosa por sorbitol. Las colonias sorbitol negativo (transparentes) se confirman por ensayos bioquímicos, serológicos, de verotoxicidad, y técnicas moleculares(37).

Debido a las bajas concentraciones de *E. coli* O157:H7 halladas en alimentos responsables de brotes, se ha visto la necesidad de utilizar métodos altamente sensibles. La técnica de Separación Inmuno-magnética (SIM), en la que anticuerpos anti-*E.coli* O157 purificados, adsorbidos y unidos covalentemente a la superficie de partículas esféricas paramagnéticas de poliestireno, reaccionan con el antígeno somático O157, recuperándose el microorganismo cuando las partículas unidas al O157, son atraídas magnéticamente y sembradas posteriormente en placas de aislamiento. En medios selectivos, como el agar MacConkey sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio (CT-SMAC) o medios cromogénicos, es un procedimiento sensible y eficaz para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos de origen animal (44,45).

Por otra parte, el Instituto Nacional de Salud de Colombia indica que para la identificación de *E. coli* O157:H7, se recomienda el método de PCR en tiempo real, el cual recientemente fue validado por la FDA (Food Drug Administration, USA) y que mostró mejor recuperación al compararlo con el método microbiológico(46). La técnica

de PRC en tiempo real principalmente se basa en la detección de una señal fluorescente emitida durante la amplificación, con lo que se dispone del resultado en tiempo real. La detección automatizada de la señal fluorescente evita la electroforesis posterior de la PCR convencional(47), además, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado (48).

Los primers o cebadores son moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de DNA de cadena sencilla que delimitan el fragmento a amplificar. En el caso de *E. coli* el gen *uidA* que codifica para la β -glucoronidasa es común a todos los serotipos de este microorganismo, pero se ha descrito una mutación en la posición +93 en el serotipo O157:H7, en el que para su uso en PCR convencional, así como en PCR en tiempo real la utilización del cebador PT2 cubre esta mutación. Para la detección por PCR en tiempo real en modo TaqMan, esta mutación es reconocida por una sonda MGB que cubre la posición +93 (47,49).

***E. Coli* O157:H7 A Nivel Mundial Y En Colombia**

Se han presentado reportes de *E. coli* O157:H7 en alimentos en Estados Unidos, Alemania, España y en otros lugares a nivel mundial, excepto en la Antártida 22,50-52. Los últimos datos disponibles en la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aportados por los países de la Unión Europea correspondientes al año 2006, recogen un total de 4.916 casos de toxiinfecciones asociadas a *E. coli* O157:H7, de los cuales 13 se produjeron

en España⁴⁷. Otra recopilación reciente estableció que en el período comprendido entre 1990-2006, se presentaron 83 brotes asociados al consumo de leche líquida de los cuales 37 estaban asociados con leche pasteurizada y 46 con leche no pasteurizada siendo causante de ello los microorganismos más frecuentemente aislados como *Campylobacter* spp.c y *E. coli* patógenas (46).

En 1998, se observó en Estados Unidos una incidencia de 2,3 por cada 100.000 habitantes, pero luego descendió a 1,1 por cada 100.000 habitantes en el 2003. Sin embargo, esta incidencia se mantuvo en los últimos años e incluso en el 2006 reportaron 29 brotes de toxiinfecciones por *E. coli* productores de toxina "shiga" (ECTS) contra 24 que se reportaron en promedio entre 2001 y 2005, de los cuales 27 fueron causados por O157. En Alemania demostraron el aislamiento de cultivos de *E. coli* portadores de toxina "shiga" que correspondía a varios serotipos, siendo el más frecuente el O157:H750. También la presencia de este patógeno ha sido informada en diversos países de Latinoamérica como Argentina, Colombia, Uruguay y Costa Rica, variando de acuerdo a su posición geográfica (asociándose a casos de diarrea y SUH)(7,41,50,53) en el que Colombia informó de su hallazgo por primera vez solo hasta el año de 1996, lo que resultó de gran importancia a nivel epidemiológico ya que anteriormente no se tenía documentado etiológicamente la presencia de este germen en el país(33). Este hecho desde entonces propició la realización de estudios en diferentes zonas del país donde se ha identificado a la bacteria a partir de diversos tipos de alimentos, agua y materia fecal(33,46). Situación que destaca la importancia de buscarlo como agente causal de EDA por consumo de alimentos contaminados (37), con un 7.2% de los casos de diarrea en Colombia, y

cuya prevalencia es del 4.7%, en pacientes pediátricos, que aunque aparentemente baja, está entre los límites de otros estudios realizados en otros países, y presentándose además con una alta tasa de incidencia en bovinos sanos (6.5%) (33).

En Colombia en el 2010 se reportó que el 30% de los productos alimentarios disponibles en supermercados en Bogotá estaban contaminados con *E. coli* enteropatógenas. Los agentes más comunes aislados de vegetales y carne de res fueron ECTS (*E. coli* productora de toxina Shiga) y ECEA (*E. coli* enteroagregativa). No se detectaron ECET (*E. coli* enterotoxigénica), ECEP clásica ni ECEI (*E. coli* enteroinvasora), las cuales están más asociadas a aguas contaminadas. Más estudios son necesarios para encontrar las fuentes más comunes de dicha contaminación y para evaluar si la contaminación de productos alimentarios varía de acuerdo con la región y a la época del año. El primer estudio sobre las ECTS en Colombia reportó la presencia en 0,87% de muestras de carne molida de res y en 6,5% de fecas de ganado vacuno (51).

En 2013, se identificó el serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en diferentes supermercados de la ciudad de Cartagena de Indias, durante agosto y Septiembre de 2008. De 60 muestras analizadas se obtuvo 36 con *E. coli* sp. en niveles no aceptables según las exigencias del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) para productos cárnicos, identificándose el serotipo O157:H7 en 17 muestras; sin embargo, en el caso de este estudio, esta caracterización debe considerarse como presuntiva de acuerdo al método utilizado, debido a que en el estudio no se demuestra su confirmación por otros métodos como los moleculares, que además pueden permitir la identificación de genes

productores de toxinas(37,54). En el Cono Sur de América, la toxiinfección por *E. coli* O157:H7 son endémicas, y esto obedece fundamentalmente a la falta de programas de vigilancia de brotes de toxiinfecciones alimentarias en toda esta región (24).

Modelos Predictivos y su Clasificación.

El estudio del crecimiento microbiano en función del medio que le rodea (el alimento), es considerado una de las bases de la microbiología de alimentos. Cada uno de los factores intrínsecos de un alimento influye sobre el desarrollo microbiano y hace que favorezca el desarrollo de unos microorganismos en detrimento de otros(55). La microbiología predictiva, definida científicamente, como la disciplina que combina elementos de matemáticas, estadística, sistemas informáticos, ingeniería, química y ecología microbiana para desarrollar modelos que describen y predicen el comportamiento de los microorganismos bajo factores específicos como: pH, Temperatura, actividad de agua (aw), entre otros(56). A partir del conocimiento de las respuestas microbianas ante los elementos del entorno se formulan ecuaciones matemáticas que describen un comportamiento, ya sea de crecimiento, supervivencia o inactivación; las cuales, se identifican como modelos predictivos microbiológicos (39).

En Microbiología Alimentaria, los modelos predictivos constituyen un método rápido, relativamente económico y no invasivo para la determinación objetiva de la calidad de los alimentos(57). Existen diferentes criterios para clasificar los modelos predictivos del crecimiento microbiano, los cuales pueden ser agrupados según su funcionamiento matemático, según su finalidad o el esquema propuesto por Whiting y Buchanan en 1993, que los ordena en modelos primarios, secundarios y terciarios (58, 59).

La primera clasificación agrupa los modelos de acuerdo con su funcionamiento matemático, en modelos empíricos y mecanicistas. Los modelos empíricos son aquellos modelos matemáticos que son desarrollados a partir de datos obtenidos experimentalmente. Dichos modelos son utilizados para describir la velocidad de crecimiento (N_{max}), la fase de latencia (LDP) y otros parámetros en función de condiciones experimentales como la temperatura, el pH, entre otras (59). En cuanto a los modelos mecanicistas se diferencian de los empíricos, debido a que estos parten de una base teórica biológica, la cual obliga al modelo a adaptarse a la realidad biológica mediante una hipótesis determinada, en consecuencia, estos modelos explican con más exactitud los datos experimentales aunque no se ajusten con tanta exactitud como los modelos empíricos a los datos utilizados para la generación del modelo. Dentro de estos modelos se destacan los que predicen la tasa de crecimiento en función de la temperatura o aquellos que describen la velocidad de catálisis enzimática a bajas temperaturas, entre otros (60).

La segunda clasificación de los modelos predictivos se fundamenta en la finalidad y agrupan los modelos en cinéticos y probabilísticos. Los modelos cinéticos estiman la respuesta de crecimiento específica, con respecto a diferentes variables como la temperatura, pH, aw, la concentración gaseosa, el potencial de oxidoreducción, humedad relativa, contenido de nutrientes y propiedades antimicrobianas. Los modelos cinéticos pueden utilizarse para predecir cambios en el número de microorganismos con respecto al tiempo, incluso cuando una variable que puede afectar al crecimiento esté cambiando. Los modelos cinéticos han sido empleados con mayor frecuencia que los probabilísticos, para modelar los efectos de variables in-

trínsecas y extrínsecas, particularmente la temperatura, en el crecimiento microbiano. Los modelos probabilísticos han sido extendidos para definir los límites de crecimiento de microorganismos en ambientes específicos, donde un único factor no es limitante pero en conjunto con otros sí previenen o inhiben el crecimiento microbiano. La probabilidad de crecimiento microbiano puede ayudar al productor de alimentos a la hora de tomar decisiones sobre de la formulación, procesamiento, envasado y almacenamiento de un producto(58).

Finalmente, según la clasificación propuesta por Whiting y Buchanan en 1993, en los modelos primarios el crecimiento de los microorganismos es descrito por los parámetros cinéticos; que son representados en tres etapas. La primera es la fase de latencia (LDP), la fase de crecimiento exponencial (μ_{max}) y finalmente, la fase estacionaria donde se alcanza la población máxima (N_{max})(61). El crecimiento de los microorganismos se ve afectado por las condiciones ambientales, la composición del alimento y por el estado fisiológico de las células (62).

Los modelos secundarios consisten en prever el comportamiento de la población microbiana (parámetros cinéticos de crecimiento) mediante el uso de modelos matemáticos, los cuales se encuentra en función de los factores propios del producto y condiciones de almacenamiento(63, 64). Dentro de esta categoría se encuentran el modelo de Arrhenius, modelos de raíz cuadrada, modelos de superficie de respuesta, modelos probabilísticos y modelos obtenidos mediante redes neuronales artificiales entre otros (59).

Los modelos secundarios pueden ser incorporados a un software, el cual con la tecnología de monitoreo adecuada pue-

de estimar la vida útil de los productos o el riesgo de pérdida de la inocuidad que atente contra la seguridad alimentaria, sin recurrir a las técnicas tradicionales de recuento en placa de los microorganismos(64); esta integración de modelos primarios y secundarios se denomina modelos terciarios (59).

Modelos Predictivos para Describir el Comportamiento de *E. Coli* O157:H7 En Alimentos

Cada año mueren en el mundo varias decenas de personas a causa de la infección alimentaria por cepas de *E. coli* O157:H7. Por tanto, su control es prioridad para gobiernos de la mitad de los países a nivel mundial en especial en Norteamérica(5). Se ha despertado un interés internacional por la microbiología predictiva particularmente en Estados Unidos y Reino Unido, también en Australia y los países del este de Europa (56). Los gobiernos, los institutos de investigación y la industria están trabajando, independientemente o en colaboración, en programas para generar las bases de datos necesarias para el desarrollo de modelos predictivos que ayuden a describir la respuesta microbiana frente a factores extrínsecos e intrínsecos al alimento, con el fin de minimizar el riesgo de ETA y controlar la aparición de la bacteria en diferentes matrices alimentarias (65).

Un ejemplo de los proyectos internacionales desarrollados con este fin, es el propuesto por el equipo de investigación HIBRO de la Universidad de Córdoba, España, en el año 2011, que buscaba controlar la aparición de *E. coli* O157:H7 en productos vegetales mínimamente procesados, mediante el diseño de un modelo matemático integrado en una aplicación informática que podría ser utilizada tanto por autoridades sanitarias como los agentes de evaluación de riesgos (66).

Concretamente los equipos científicos de las Universidades de Córdoba (UCO), Georgia y Clemson, el Instituto de tecnología de Illinois, la Universidad estatal de Michigan (UEM) y Consultores del Servicio de Investigación en Agricultura del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-ARS), la Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés FDA) y el Consorcio de Investigación de seguridad de los alimentos (por sus siglas en inglés FSRC), trabajan en diferentes aspectos: en la inactivación de *E. coli* sp. sobre el compost; en el estudio de la contaminación superficial en vegetales de hoja; en la transferencia de la bacteria durante operaciones de procesamiento; en el análisis del agua de tratamiento como un indicador de contaminación; en las intervenciones de proceso para reducir *E. coli* O157:H7 en productos vegetales de hoja y en el efecto del almacenamiento post-cosecha. Todos los datos derivados de estas líneas de investigación son empleados por investigadores de la UCO y la UEM en el desarrollo de un modelo matemático de riesgo con el fin de identificar estrategias de mitigación de la bacteria (66).

Actualmente el grupo cordobés, cuenta con una herramienta en-línea desarrollada por ellos, llamada MicroHibro (<http://www.microhibro.com/>), un espacio virtual de trabajo, de carácter integrado y personalizado que permite evaluar el riesgo microbiano en vegetales y productos cárnicos. Ésta posee un sistema de control y cuentas de usuarios con el objeto de restringir el acceso a personas del ámbito empresarial, público y académico interesadas en realizar estudios de evaluación del riesgo. MicroHibro, se encuentra estructurada en tres módulos. En el primer módulo, cuenta con un sistema de predicción del crecimiento microbiano en productos cárnicos (carne

cocida con o sin nitritos, carne, carne de cerdo, carne curada lista para el consumo y salchichas) y vegetales (Acelga, vegetales de hoja, lechuga, lechuga MAP, perejil y espinacas) bajo diferentes condiciones ambientales (pH, NaNO₂, Temperatura, Aw, NaCl, Lactato K, RH y Diacetato Na); las bacteria utilizadas para las realización de los modelos predictivos de crecimiento y muerte microbiana son *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, siendo esta última la bacteria con más modelos descritos, especialmente en los modelos de crecimiento en vegetales donde sólo se modela este patógeno (65,66).

También, se permite realizar estimaciones de los parámetros cinéticos como tasa máxima de crecimiento, tiempo de latencia y densidad máxima de población, basadas en la combinación de modelos secundarios de tipo Gamma, Ratkowsky o raíz cuadrada y tipo Cardinal y primarios como el modelo de Gompertz y el modelo de Baranyi y Robert en 1994, contenidos en esta base de datos. Igualmente, reproducen la curva de crecimiento, proporcionando el nivel de microorganismo a diferentes intervalos de tiempo 30. El segundo módulo, incluye un sistema de validación, cuyo propósito es comparar las predicciones de un modelo seleccionado con valores reales proporcionados por el usuario, se encuentra basado en diferentes índices estadísticos y una representación gráfica, se puede evaluar si el modelo realiza predicciones certeras para un alimento dado sobre el que el usuario ha realizado la validación. El tercer módulo es una herramienta para el desarrollo de modelos probabilístico del riesgo, éste permite diseñar su propio modelo de riesgo basado en la combinación de diferentes procesos básicos que describen los cambios de concentración y prevalencia de un determinado microorganismo a lo largo de una cadena alimentaria

específica. En cada proceso, se pueden definir las variables fundamentales a través de valores puntuales o distribuciones de probabilidad. Así mismo, los resultados pueden ser analizados mediante la utilización de escenarios o herramientas de análisis de sensibilidad (65).

En esta aplicación, el usuario puede realizar simulaciones “*in silico*” para condiciones específicas, proporcionando una estimación del riesgo asociado al alimento, proceso y patógeno objeto de estudio. El enfoque estocástico de la aplicación permite considerar todos los posibles escenarios de riesgo, ayudando a tener una visión más completa del caso analizado (41).

Con el propósito de garantizar la seguridad alimentaria el Servicio de Investigación en Agricultura del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), en conjunto con el Eastern Regional Research Center (ERRC) y complementado con estudios independientes de diversas fuentes de investigación, han desarrollado un Programa de Modelado de Patógenos (PMP Versión 6.0) (39-43), puesto a disposición de la comunidad científica gratuitamente, el cual consiste en un paquete de modelos terciarios (combina los modelos primarios y secundarios) que se pueden utilizar para predecir el crecimiento, supervivencia, enfriamiento, transferencia e inactivación por calor de 15 bacterias transmitidas por los alimentos, principalmente patógenas, bajo diversas condiciones ambientales intrínsecas y extrínsecas(18). Estas predicciones son específicas de ciertos ambientes (por ejemplo, medios de cultivo, alimentos, etc.) y cepas bacterianas específicas (entre las que se encuentra *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium botulinum* y otras), que se utilizan para generar los modelos, por lo que la precisión de

estas predicciones no se puede garantizar para otras cepas bacterianas y/o ambientes, sin estudios de validación adecuados. Específicamente para *E. coli* O157:H7 esta herramienta describe modelos de crecimiento (en medio de cultivo aerobio y anaerobio), supervivencia e inactivación en alimentos como carne molida con aditivos, jamón cocido y salchichas, pudiendo ajustar las variables de temperatura, pH, NaCl, Nitrito de sodio, Lactato de sodio, Aw, y pirofosfato de sodio dependiendo del modelo (40,67).

Existe otro programa informático que ayuda a predecir el comportamiento de microorganismos bajo determinadas situaciones, si así se quiere. Dicho programa fue desarrollado por Palisade Corporation, denominado @Risk®, un software que se incorpora a Microsoft Excel, asegurando flexibilidad, facilidad de uso y gran atractivo en una amplia gama de sectores de la industria, desde las áreas financieras hasta las científicas (finanzas, gestión de proyectos, energía, manufacturación, ingeniería, investigación y desarrollo, seguros, petróleo y gas, transporte y medio ambiente) (68), cualquiera que tenga incertidumbre en sus análisis cuantitativos, utilizando simulación de Monte Carlo(69). La aplicación debe ser comprada para ser utilizada indefinidamente, sin embargo cuenta con una versión gratuita de prueba por quince días disponible para todo usuario en <http://www.palisade-lta.com/trials.asp>. Este programa permite realizar análisis de riesgo utilizando la simulación para mostrar múltiples resultados posibles en un modelo de hoja de cálculo, y le indica qué probabilidad hay de que se produzcan. Computa y controla matemática y objetivamente gran número de escenarios futuros posibles, y luego le indica las probabilidades y riesgos asociados con cada uno. Es decir, que el programa permite decidir los riesgos que se desean tomar y cuáles se prefieren evi-

tar, tomando la mejor decisión en situaciones de incertidumbre (42,70).

Ejemplo del uso de este software a nivel científico, es el que nos ofrece Olvera A, *et. al* 2010, quienes desarrollaron un proyecto de investigación en Argentina, que tuvo como objetivos cuantificar la frecuencia y la magnitud de la contaminación por *E. coli* O157:H7 en las canales de ganado bovino y generar estimaciones de exposición en tres escenarios probables: la vacunación de las reses, la descontaminación de las canales y el sistema de engorde. Para esto, se modeló la frecuencia y la concentración de la contaminación por *E. coli* O157:H7 desde la producción primaria de bovinos hasta la canal a la salida del frigorífico, a partir de la información científica publicada y datos epidemiológicos y de expertos locales. El modelo de simulación estocástico se creó en Microsoft Excel 2007 y @Risk® (versión 4.0, Palisade Corporation, New York, Estados Unidos), donde se realizaron 5,000 iteraciones con la técnica de simulación Monte Carlo(31,37). Las dos variables de interés (medidas de resultado) del modelo fueron la proporción de canales contaminadas con *E. coli* O157:H7 y la magnitud de esa carga bacteriana a la salida del frigorífico. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que la vacunación de los animales resultó el escenario más eficaz para reducir el ingreso de la bacteria en la cadena agroindustrial de la carne bovina(6).

Teniendo en cuenta este estudio, no es necesario contar con una aplicación exclusiva para el modelado predictivo de microorganismos, sino que existen otras, de tipo "genérico", que nos permiten tomar decisiones de situaciones futuras teniendo en cuenta datos reales que nos arrojen resultados confiables.

Conclusiones

Escherichia coli O157:H7 es un patógeno con gran importancia a nivel mundial en los alimentos y en la salud pública, debido a que es transmitido a los seres humanos principalmente por alimentos básicos de la canasta familiar (agua, carne y vegetales) y que por presentar dosis infectiva baja, aumentando el riesgo en el consumidor a desarrollar enfermedades asociadas no sólo a cuadros clínicos típicos de las toxoinfecciones alimentarias, sino hasta síntomas severos como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA).

Si bien la prevalencia de este patógeno en Latinoamérica es aún incierta, lo que es claro es que varía según la localización geográfica, por lo que predecir el comportamiento de dicho patógeno en los alimentos es un gran reto, donde confluyen diversidad de factores. Aplicaciones diseñadas con base a modelos predictivos del crecimiento o inactivación del desarrollo microbiano pueden ser una herramienta de mucha ayuda para lograr este objetivo. El modelo de *E. coli* O157:H7 se basa en el principio general de todo modelo predictivo para comprender los riesgos de las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos.

En Colombia, actualmente no se han desarrollado modelos predictivos para describir el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en alimentos, por tanto en los estudios predictivos pueden ser utilizadas aplicaciones como Modelado Predictivo de Patógenos (PMP) propuestos por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), MicroHibro de España y software como @Risk® de New York. Predecir el comportamiento de este microorganismo en las distintas matrices alimentarias ayudaría en la mitigación de su impacto como agente

productor de ETA, permitiendo tomar las medidas necesarias y llevar a cabo un control microbiológico efectivo, logrando garantizar la calidad de estos alimentos a los consumidores. Esto, generaría avances no solo en la industria alimentaria sino también en la prevención de enfermedades, afectando positivamente la salud pública del país.

Referencias Bibliográficas

1. Guerrero A. Protocolo de vigilancia en Salud Pública. Enfermedades Transmitidas por alimentos. 2016. Instituto Nacional de Salud.;3-4
2. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Guía para la Atención de Brotes de ETA (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) 2011. [Internet] Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20Emergencias/Guia%20Atenci%C3%B3n%20de%20Brotes%20ETA1%20Vr%204.pdf>. Acceso: Octubre 7 de 2016.
3. OMS. Educación e inocuidad de alimentos: glosario de términos. 2016. [Internet] Disponible en: Acceso: Noviembre 7 2016.
4. Rivas M, Leotta G, Chinen I. Manual de procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. 2008. [Internet] Disponible en: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=IhIAPw7G8c%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>. Acceso: Noviembre 6 de 2016.
5. OMS, FAO y Codex. Documento de debate sobre el perfil de riesgos para *Escherichia coli* enterohemorrágica, incluida la identificación de los productos básicos de interés, entre ellos las semillas germinadas y la carne molida de res y puerco. 2004. [Internet]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCFH/CCFH36/fh0410bs.pdf>. Acceso: Octubre 7 de 2016.
6. Olvera A, Signorini M. *Escherichia coli* verotoxigénica: modelo cuantitativo de exposición y escenarios de riesgos en canales bovinas en Argentina. Rev Panam Salud Pública. 2010, 27(6):403-13.
7. Díaz, T., Valdés-Dapena M., Caballero, A. y Monterrey, P. Enfermedades transmitidas por alimentos. Causas más frecuentes en los niños. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Hospital Pediátrico "Juan Manuel Marquez. 2003, 1: 12-19.
8. Rivero M, Padola N, Etcheverría A, Parma A. 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. Medicina 64(4): 352 - 356
9. Hannaoui E., Villalobos L, Martínez R. *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2009; 29(1): 13-20.
10. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. 2002. Salud pública México. 44(5): 464-475
11. Llamosas M. Serotipificación de cepas de *Escherichia coli* aisladas de neonatos de alpacas (Vicugna pacos) con diarrea en Cerro de Pasco. 2016. [Internet]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4928/1/Llamosas_am.pdf Acceso: Enero 10 de 2017
12. The center for food security and public health. *E. Coli* enterohemorrágica. 2009. [Internet]. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ecoli-es.pdf>. Acceso: Enero 10 de 2017.

13. FAO. Prevención de la *E. coli* en los alimentos. 2013. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf. Acceso: Noviembre 14 del 2016
14. Narváez C, Carruyo G, Moreno M, Rodas A, Hoet A, Wittum T. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en Muestras de Heces de Ganado Bovino Doble Propósito del Municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ/ 2007, XVII (3): 239-245.
15. Sánchez S, Martínez R, Alonso J y Rey J. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 28. Núm. 6 Cáceres, España. Editorial ELSEVIER DOYMA ; 2010. p. 370-374
16. Michanie S. *Escherichia coli* O157:H7, la bacteria que dispara el HACCP en la industria de la carne. 2003. Rev. Ganado y Carne, 4(17):40-42 e Información Veterinaria, CMVPC, Córdoba, 138:36-38.
17. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N et al. The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. Medicina (Buenos Aires) 2006, 66 (Supl.III): 27-32.
18. Signorini M. Modelo matemático predictivo del crecimiento de *Escherichia coli* O157 en carne vacuna. Scielo. 2008. 8(1): 47-57
19. OMS. Brote de *Escherichia coli* O157:H7 en espinacas. 2007. [Internet] Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_spinach_Feb06_sp.pdf. Acceso: Noviembre 13 del 2016
20. Bhat M, Denny J, MacDonald K, Hofman J, Jain S, y Lynch M. *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking raw milk- Washington and Oregon, November-December 2005. 2007. Morbidity and Mortality Weekly Report, 56(08): 165-167.
21. Instituto Nacional de Salud, Grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos. Perfil de riesgo de *Escherichia coli* enterotoxigénica y verotoxigénica en queso fresco. Bogotá, D. C., Colombia. 2015: 20-52
22. World Health Organization. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). 2011. [Internet] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/index.html>. Acceso: Noviembre 14 del 2016
23. Mattar S y Vásquez E. *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Colombia. 1998. Enfermedades infecciosas emergentes. Emerging Infectious Diseases. 1998. 4(1):126-127.
24. Marzocca M, Marucci P, Sica M, Álvarez, E. Detección de *Escherichia coli* O157: H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. Revista Argentina de Microbiología. 2006. 38(1): 38-40
25. Hoornstra E, Northolt MD, Notermans S, Barendsz AW. The use of quantitative risk assessment in HACCP. Food Control [Internet]. 2001 Jun [cited 2015 Nov 17];12(4):229-34.
26. Rolz C. Microbiología de predicción: una base de conocimiento para asegurar la calidad de los alimentos. Revista 14 de la Universidad de Guatemala. 2005. 14 :44-57
27. Olsen S, McKee G, Fox K, Bibb W. y Mead P. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic Syndrome: implications for rural water systems. NCBI. 2002. 8(4):370-5
28. Barslund S, Benitez J, L y Wilka N. Síndrome Urémico Hemolítico.

2007. Revista de Posgrado de la V la Cátedra de Medicina. 1(170): 16-20.
29. Córdoba C, Blanco A, Malawka J y Del Carmen V. Síndrome Urémico Hemolítico. Revista de Posgrado de la V la Cátedra de Medicina. 2007. 1(166): 25-31.
30. Ministerio de salud. Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en Argentina, 2010-2013. 2014. [Internet] Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000799cnt-2014-08_Informe-SUH.pdf. Acceso: Noviembre 15 del 2016
31. Cuéllar L, López R, Gastelbondo R et al. Síndrome Hemolítico Urémico en la Población Infantil de Bogotá, 1992-2002. Revista Colombiana de Pediatría. 2003. 40(3).
32. Olvera A, Signorini M. Modelo de contaminación cruzada por *Escherichia coli* verocitotoxigénica durante la elaboración de hamburguesas caseras y evaluación cuantitativa de riesgos. Rev Argent Microbiol. 2009. 41(4):237-44.
33. Máttar S, Visbal J, Arrieta G. *E. coli* O157: H7 Enterohemorrágico: Un agente etiológico de diarrea y zoonosis en Colombia subestimado. Parte I. Revista MVZ Córdoba. 2001, 6(1): 15-23.
34. Instituto Nacional de Salud. Comportamiento de los eventos de vigilancia en salud pública Enfermedades transmitidas por alimentos y vehiculizadas por el agua. 2016. [Internet] Disponible en: www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletin%20Epidemiologico/2016%20Bolet%20C3%ADn%20epidemiol%20C3%B3gico%20semana%2044.pdf. Acceso: Octubre 5 de 2016
35. Bhaduri S, Hwang A, Juneja V et al. Microbial Modeling & Bioinformatics for Food Safety and Security. 2005. [Internet] Disponible en: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/19353000/pdffiles/cris057.pdf>. Acceso: Octubre 5 de 2016
36. Posada D. Estudio y modelización del efecto de procesos de descontaminación y desinfección sobre microorganismos patógenos en productos vegetales. 2013;24.
37. Anaya P, Medina L, Ugarriza M, Gutiérrez L. Determinación de *Escherichia coli* e identificación del serotipo O157: H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. Rev Lasallista Investig. 2013. 10(1):91-100.
38. Realpe M, Muñoz Á, Yela J. Manual de procedimientos para la identificación de *Escherichia Coli*. 2011; 1-16. [Internet] Disponible en: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-interes-en-salud-publica/Microbiologa/MNL-R01.001.5030-020 Manual final coli.pdf>. Acceso: Noviembre 15 del 2016
39. Yarce C. Microbiología predictiva: una ciencia en auge. Universidad Antonio Nariño - Revista Facultades de Ingeniería IngeCuan, ISSN 2145 - 0935. 2013. 3(6): 31-43.
40. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. 2015. [Internet] Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/main/main.htm>. Acceso: Noviembre 15 del 2016
41. Universidad de Córdoba-España. Una aplicación informática permitirá predecir los efectos de bacterias en alimentos vegetales. 2012. [Internet] Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/main/main.htm> Acceso: Octubre 10 del 2016

42. Corporation Palisade. @Risk®. 2016. [Internet] Disponible en: <http://www.palisade-lta.com/sobre/>. Acceso: Octubre 10 del 2016
43. Corrales V y Cáceres F. Evaluación del desempeño del PMP 6.0 (Pathogen Modeling Program) para *Escherichia coli* a 22°C, 37°C y 42°C en un alimento. 2002. [Internet] Disponible en: <http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/5061/130039.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acceso: Octubre 11 del 201
44. Roldán M. et al. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Revista Argentina de Microbiología. 2007. 39: 113-119.
45. Rivas M, Miliwebsky E. y Deza N. Manual de procedimientos- Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de especímenes clínicos. 2007. [Internet] Disponible en: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=NmZogH4P%2Bmk%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>. Acceso: Octubre 11 del 2016.
46. Instituto Nacional de Salud Pública. Identificación de Riesgos Biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. [Internet] Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/ER%20PELIGROS%20BIOLOGICOS%20EN%20LECHE.pdf>. Acceso: Octubre 14 de 2016.
47. Elizaquível, P. Detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en alimentos vegetales mediante PCR a tiempo real. Universidad de Valencia. 2009. [Internet] <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/38154/AAIU607776.pdf?sequence=1>.
48. Costa J. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 2004; 22(5):299-305
49. Pérez A. Reacción en cadena de la Polimerasa (Polymerase chain reaction, PCR). 2009. Universidad Politécnica de Valencia. [Internet] Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>. Acceso: Diciembre 29 de 2016
51. Guerrero C, Guillén A y Rojas R. Vigilancia de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos y aguas. Cátedra Villareal. 2013. 1 (1): 35-45.
52. Gómez O. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. Revista Chilena Infectol 2014; 31 (5): 577-586. [Internet] Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v31n5/art10.pdf>. Acceso: Julio de 2016.
53. Elizaquível P. Detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en alimentos vegetales mediante PCR a tiempo real. 2014. [Internet] Disponible en: <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/38154/AAIU607776.pdf?sequence=1>. Acceso: Julio 2016.
54. Kasnowski C, Franco R, Trindade L, Valente A, Carvalho J y Carlos A. Detección, caracterización serológica y antibiogramas de *Escherichia coli* aisladas de carne de ternera (babilla) entera y picada. Revista de Salud Pública y Nutrición. 2008. 9(3).

55. Soto Z, Pérez L y Estrada D. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. 2016. Salud, Barranquilla 32 (1): 105-122.
56. García R. y Zurera G. Modelización predictiva del desarrollo bacteriano en los alimentos. 2004. Real academia de ciencias veterinarias de Andalucía Oriental. ANALES - 17(1): 61- 78
57. Parra, F. (2009). Aplicación de la evaluación de riesgos microbiológicos en la industria de alimentos. In Universidad de Minesota (EE UU) 1(1):1-7
58. Martínez J. Microbiología predictiva y vida útil del alimento: 7 pasos para obtener modelos de diagnóstico. [Internet] Disponible en: <http://www.ainia.es/tecnalimentalia/tecnologia/Microbiología-predictiva-y-vida-util-del-alimento-7-pasos-para-obtener-modelos-de-diagnostico/> Acceso: Enero 10 de 2017.
59. Rodríguez M. Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. 2003. Universidad de Córdoba Departamento de bromatología y tecnología de los alimentos [Internet] Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/218/13207957.pdf?sequence=1> Acceso: Enero 12 de 2017
60. Buelvas G. Desarrollo y validación de modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano para estimación de la vida útil en jamón lonchado empacado al vacío. 2013. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín [Internet] Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/11821/1/1102818959.2013.pdf> Acceso: Enero 12 de 2017
61. Salvador, J. 2013. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos. 2013. Universidad Complutense de Madrid. [Internet] Disponible en: <http://eprints.ucm.es/21020/> Acceso: Enero 12 de 2017
62. Sun, D. wen. Handbook of Food Safety Engineering. Editorial Wiley Blackwell; 2012. p. 1- 855.
63. Baranyi J. y Pin C. Modelling microbiological safety. Editorial In Woodhead publishing; 2001. p. 1- 19.
64. Garcés F. Modelamiento del efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de sustancias inhibitorias de bacterias del *Lactobacillus acidophilus*. 2003. Universidad de la Sabana - Bogotá. [Internet] Disponible en: <http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/5099/129993.pdf?sequence=1> Acceso: Enero 12 de 2017
65. McMeekin, T. A. (2007). Predictive microbiology: Quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. Meat science, Vol. 77(1), Pág. 17–27.
66. Pérez, F y Zurera, G. Aplicación “online” de Evaluación del Riesgo Microbiano en Vegetales MicroHibro. [Internet] Disponible en: http://www.microhibro.com/docs/user_guide_spa.pdf. Acceso: Agosto 28 de 2016
67. Universidad de Córdoba- España. Diseñan un modelo matemático para prevenir la infección por *E. coli* 0157:H7 en vegetales. 2001. [Internet] Disponible en: <http://www.uco.es/servicios/comunicacion/component/k2/item/77446-dise%C3%B1an-un-modelo-matem%C3%A1tico-para->

- prevenir-la-infecci%C3%B3n-por-e-coli-0157h7-en-vegetales. Acceso: Agosto 28 de 2016
68. Juneja V, Use of Predictive Microbiology Information Portal, the USDA-Pathogen Modeling Program and ComBase. 2004. [Internet]. Disponible en: http://ccm.ytally.com/fileadmin/user_upload/downloads/publications_5th_workshop/Juneja_talk.pdf. Acceso: Julio de 2016.
69. Corporation Palisade. Simulación Monte Carlo. 2016. [Internet]. Disponible en: http://www.palisade-lta.com/risk/simulacion_monte_carlo.asp. Acceso: Julio de 2016.
70. Palisade Corporatio. @RISK. 2009. [Internet]. Disponible en: http://www.palisade-lta.com/risk/?utm_source=PPC&utm_medium=GoogleAdwords&utm_campaign=RISK&gclid=COPWjPyZtNACFU4Ghgod4a0EyA. Acceso: Julio de 2016
71. Palisade Corporation. @RISK: Risk Analysis and Simulation Add-In for Microsoft® Excel. 2010. [Internet]. Disponible en: https://www.palisade.com/downloads/manuals/EN/RISK5_EN.pdf. Acceso: Noviembre 10 de 2016.