



Proceso Análisis de Riesgos del Sistema Nacional de Inocuidad y Calidad Alimentaria

## **OPINION CIENTÍFICA N°1/2017**

# **“EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS EN FRAMBUESAS CHILENAS”**

### **Elaborado por:**

Universidad de Nebraska-Lincoln

### **Solicitado por:**

Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, en colaboración con la Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria, ACHIPIA

**Descargo de responsabilidad:** Las opiniones o posiciones expresadas en esta publicación no representan necesariamente, en términos legales, la posición oficial de la Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria (ACHIPIA). La ACHIPIA no asume ninguna responsabilidad por los errores o inexactitudes que puedan aparecer.

## **I. ANTECEDENTES**

A fines de 2014, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) solicitó a ACHIPIA gestionar una evaluación de los riesgos (ER) microbiológicos de las frambuesas producidas por pequeños agricultores que están registrados en el “Programa de Control Oficial en Frambuesas de Exportación” ([Resolución N°3.410/2002](#)). La inquietud del SAG surgió producto de algunos rechazos de exportaciones por la detección de Hepatitis A. Adicionalmente este proyecto estudió el programa de control vigente, analizar su efectividad y proponer mejoras en las actividades de control.

ACHIPIA, en su rol de coordinación, se puso en contacto con la Universidad de Nebraska-Lincoln para realizar la ER. De esta forma se creó el primer proyecto científico entre el Gobierno y la Academia en inocuidad alimentaria, coordinado por ACHIPIA.

Como esta experiencia fue desarrollada previamente a la creación del Proceso Análisis de Riesgo (PAR), no hubo un proceso de licitación. Un alumno de postgrado desarrolló este estudio en el departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos de UNL como parte de su tesis. ACHIPIA actuó como coordinador general del proyecto, facilitando la gestión y comunicación entre UNL y el SAG.

## II. ESTUDIO

### **Evaluación de Riesgo microbiológico en frambuesas frescas y congeladas en Chile.**

*Autores*

Juan Eduardo Ortuzar, MSc <sup>a</sup>

Bing Wang, PhD<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria, ACHIPIA*

<sup>b</sup> *Departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Nebraska-Lincoln.*

#### **Resumen**

Con el objetivo de evaluar los riesgos microbiológicos y conocer la efectividad del “Programa de Control Oficial en Frambuesas de Exportación” que lleva a cabo el Servicio Agrícola y ganadero (SAG), es que durante 2015-2016 se realizó una evaluación de riesgos por parte de la Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Nebraska-Lincoln (UNL). La Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad de los Alimentos (ACHIPIA) actuó como coordinador del proyecto y de la relación entre los participantes, a saber, UNL como ente científico y SAG como mandante. Se acordó estudiar la concentración de Hepatitis A y *E. coli* (como indicador de contaminación fecal) a lo largo de toda la cadena en frambuesas frescas y congeladas.

En primer lugar, se desarrolló un modelo de la producción de frambuesas. Luego se hizo una revisión bibliográfica de todas las evaluaciones de riesgos en esa matriz o similares, para obtener datos relevantes a las fuentes, transferencia y persistencia de contaminación y los parámetros matemáticos pertinentes que describen la dinámica de concentración de estos microorganismos. Durante la temporada de cosecha 2016 se realizaron 3 encuestas a productores, centros de acopio y packing, donde se recopiló información sobre las prácticas actuales en aplicación de plaguicidas, tipo de agua disponible para producción, lavado de manos, prácticas de almacenamiento, temperaturas y tiempos de transporte entre muchas otras. Con estos datos se pudo alimentar el modelo matemático y realizar una simulación de Montecarlo usando el software @Risk con muestreo Hipercubo Latino, obteniendo estimados estocásticos de la contaminación final en frambuesas frescas y congeladas. Además, se realizó un análisis de sensibilidad para conocer cuáles son los factores que tienen mayor relevancia en la contaminación de las frambuesas. Finalmente se simularon algunas intervenciones como propuestas de mejora al programa de control.

El intervalo de probabilidad (95%) para todos los estimados de concentración fueron muy bajos, bajo 0 log CFU/g para contaminación bacteriana y viral. El análisis de sensibilidad indicó que los factores más importantes en la contaminación bacteriana es el tipo de agua usada en las aplicaciones de plaguicidas y para la viral, el tiempo de la última aplicación del plaguicida (relacionado con la tasa de decaimiento). De esta forma, las simulaciones de intervenciones fueron diseñadas con el objetivo de mejorar la calidad de agua usada en las aplicaciones de plaguicidas, desde una perspectiva regulatoria como también de limpieza con dispositivos de luz UV. Los resultados estas simulaciones indicaron que un cambio regulatorio sería mucho menos eficiente que el uso de dispositivos UV. A pesar de que los resultados indican que la contaminación es muy baja, este estudio sugiere focalizar los esfuerzos de fiscalización y control en el agua utilizada en las aplicaciones de plaguicidas antes que en otras etapas del proceso.

## **A. Introducción**

A fines de 2014, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) solicitó a ACHIPIA gestionar una evaluación de los riesgos (ER) microbiológicos de las frambuesas producidas por pequeños agricultores que están registrados en el “Programa de Control Oficial en Frambuesas de Exportación” (Resolución N°3.410/2002). La inquietud del SAG surgió producto de algunos rechazos de exportaciones por la detección de Hepatitis A. Adicionalmente este proyecto estudió el programa de control vigente, analizar su efectividad y proponer mejoras en las actividades de control.

ACHIPIA, en su rol de coordinación, se puso en contacto con la Universidad de Nebraska-Lincoln para realizar la ER. De esta forma se creó el primer proyecto científico entre el Gobierno y la Academia en inocuidad alimentaria, coordinado por ACHIPIA.

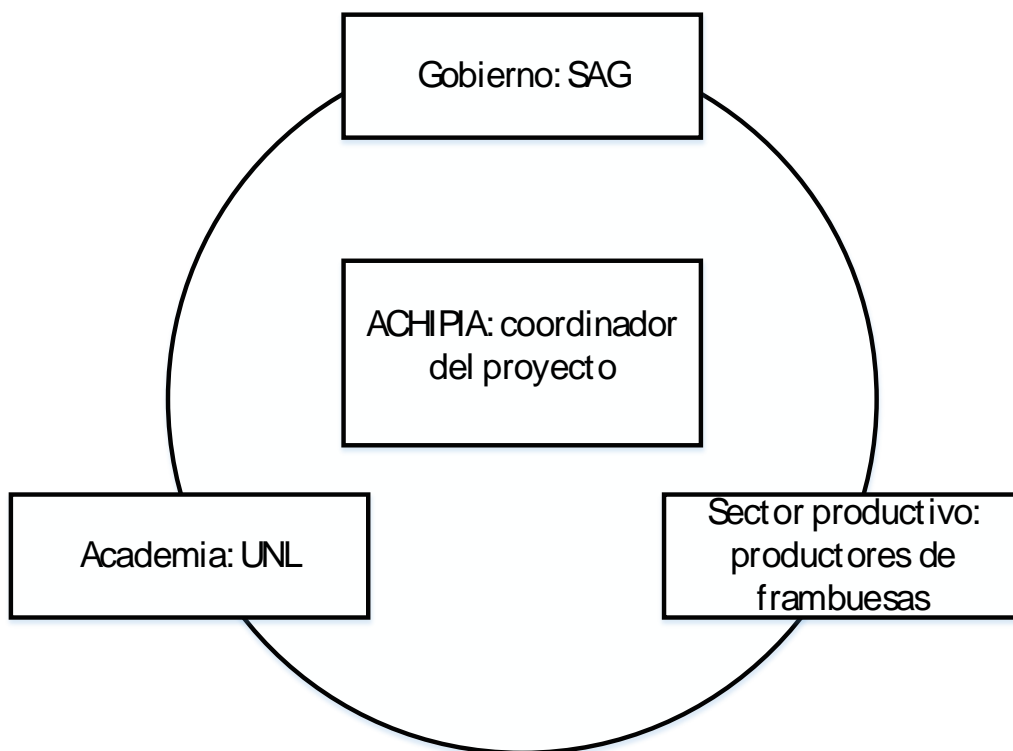
Como esta experiencia fue desarrollada previamente a la creación del Proceso Análisis de Riesgo (PAR), no hubo un proceso de licitación. Un alumno de postgrado desarrolló este estudio en el departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos de UNL como parte de su tesis. ACHIPIA actuó como coordinador general del proyecto, facilitando la gestión y comunicación entre UNL y el SAG.

## **B. Objetivos**

1. Conocer la concentración de *E. coli* y Hepatitis A en frambuesas frescas y congeladas producidas en Chile por agricultores suscritos al programa de control del SAG.
2. Identificar las principales fuentes de contaminación y proponer estrategias de mitigación del riesgo.
3. Proponer mejoras al programa de control del SAG con el objeto de insertar criterios de riesgo.
4. Explorar la experiencia de trabajar en una colaboración directa con la Academia.

## **C. Materiales y Métodos**

La colaboración comenzó con el desarrollo de un perfil de proyecto, el cual consistió en la formulación del problema, el alcance y el esbozo del proyecto, el rol y las responsabilidades de las partes involucradas en detalle (Figura 1). Las actividades, los resultados esperados y las responsabilidades fueron acordados por todas las partes sirviendo como hoja de ruta para este proyecto.



**Figura 1** Modelo de colaboración usado en este estudio.

El proyecto de evaluación de riesgo incluyó los siguientes pasos principales:

1. Diseñar y aplicar encuestas para productores, centros de acopio y packing.
2. Crear un diagrama del flujo de la cadena de suministro de la frambuesa.
3. Recopilar datos de bibliografía y encuestas.
4. Construir un modelo cuantitativo de evaluación de riesgos.
5. Simulación de Monte Carlo.
6. Análisis de escenarios.
7. Inferencia de resultados.

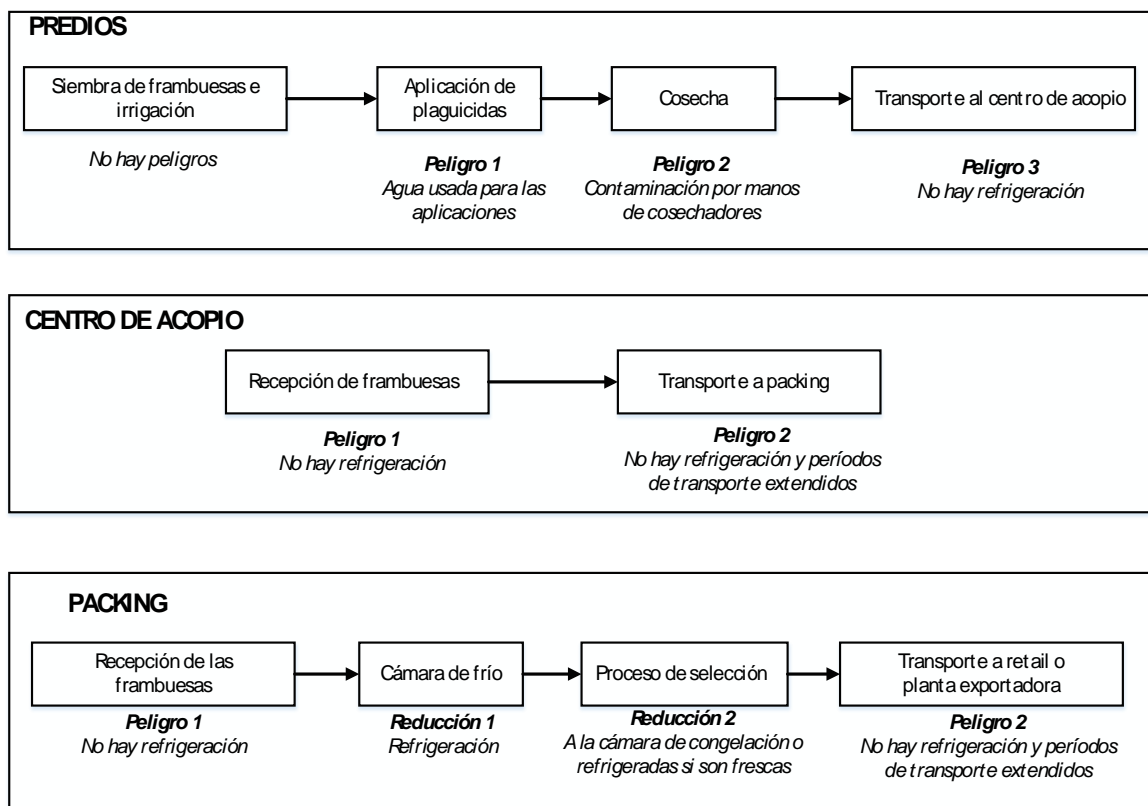
#### Encuestas a productores, centros de acopio y packing

Se diseñó una encuesta para ser aplicada a principios de 2016 (febrero-marzo), el cual es el momento en el que generalmente se cosecha la frambuesa y cuando las auditorías SAG se realizan más intensivamente. El objetivo de las encuestas fue de recopilar datos que puedan incorporarse en la evaluación cuantitativa de riesgos para simular cómo las prácticas pueden influir en la introducción y transmisión de las cargas microbianas hacia los productos finales. De esta manera, estas encuestas

fueron fundamentales para reducir la falta de datos y que éstos representen nuestra realidad local. Las encuestas fueron aplicadas en español y están disponibles en los anexos S1, S2 y S3.

Diagrama del flujo de la cadena de suministro de la frambuesa

Se estableció un proceso de tres etapas: Productores, Centros de Acopio y Packing (Figura 2). La siguiente es una descripción general del proceso: los productores siembran las frambuesas, se irrigan, se les aplican pesticidas y fertilizantes y finalmente se cosechan durante el verano (enero-marzo). El Centro de Acopio es el lugar donde las frambuesas de diferentes agricultores son recolectadas y vendidas en un único paquete a la planta de packing. El packing es el lugar donde las frambuesas se inspeccionan visualmente y se seleccionan para la exportación (las de mejor calidad) o se envían para hacerlas jugo y otras frutas procesadas (las de menor calidad) o son desechadas.



**Figura 2** Diagrama de flujo de los pasos del procesamiento de la frambuesa, incluyendo peligros potenciales y pasos de reducción en la planta de envasado.



Los productos terminados que se estudiaron son frambuesas frescas y congeladas. En discusión con SAG y ACHIPIA, se estudió la contaminación por *E. coli* y virus de Hepatitis A, ya que previamente habían enfrentado detecciones fronterizas (indicación del personal de SAG).

#### Recopilación de datos y encuestas

Como se mencionó anteriormente, los agricultores chilenos fueron encuestados y se recopiló información sobre las prácticas de producción. Las encuestas se diseñaron en inglés, traducidas al español y las respuestas se recopilaron en una hoja de cálculo de MS Excel®. Para los productores se recibieron 226 encuestas, 23 para el centro de acopio y 36 para el packing.

La búsqueda bibliográfica fue realizada utilizando los recursos de la biblioteca de UNL, principalmente la base de datos de la Web of Science. Los datos fueron ajustados en @Risk (Palisade Corporation, 2016) e integrados en el modelo de evaluación de riesgos.

#### Modelo cuantitativo de evaluación de riesgos

Las tablas 1 a la 8 indican los datos utilizados en el modelo de evaluación de riesgos. Basado en la información recopilada, se construyeron diferentes ecuaciones para modelar cada uno de los pasos en el modelo de evaluación de riesgos.

#### Contaminación previa a la cosecha (Módulo productores)

El objetivo de este módulo es el de comprender cómo la contaminación desde el agua se transfiere a los cultivos durante la aplicación del pesticida. La concentración en la frambuesa durante la etapa previa a la cosecha ( $C_{ph}$ ) se calculó en función de la concentración en la frambuesa después de la última aplicación de pesticidas ( $C_{ap}$ ), el tiempo entre la última aplicación y la cosecha ( $T_{ap}$ ) y la tasa de decaimiento ( $D$ ) utilizando los siguientes cálculos propuestos por Danyluk et al. [5]:

$$C_{ph} = C_{ap} - T_{ap} * D \quad (1)$$

Stine y colegas calcularon la tasa de transferencia de bacterias y virus durante una aplicación de pesticidas [6]. Esta información se usó para calcular  $C_{ap}$ , que es el producto de la concentración de contaminación del agua utilizada ( $C_w$ ) y la tasa de transferencia bacteriana o viral (Bac\_transf y Vir\_transf).

**Tabla 1** Lista de parámetros, valores y distribuciones usadas en el módulo de producción de frambuesas frescas y congeladas.

<i>Parámetro</i>	<i>Descripción</i>	<i>Distribución/Unidad</i>	<i>Referencia</i>
<i>(fuente del dato)</i>			
w_t_pest (Encuesta)	Tipo de agua usada para la aplicación de plaguicidas 1 – De pozo 2 – Superficiales 3 – Potable	Discreta 1 – 71% 2 – 15% 3 – 14%	Ajuste de @risk
C <sub>w_1</sub> (Literatura)	Contaminación bacteriana de aguas de pozo	Uniforme (0;1000) CFU/L	GDWQ, 3rd Edition [1]
C <sub>w_2</sub> (Literatura)	Contaminación bacteriana de aguas superficiales	Pareto (1,31;2900) CFU/L	Ajuste de @Risk de Schets et al., 2008 [2]
C <sub>w_3</sub> (Literatura)	Contaminación bacteriana de agua potable	Uniforme (0,01;0,1) CFU/L	Norma chilena “Nch 409” [3]
C <sub>w_4</sub> (Literatura)	Contaminación viral de aguas de pozo	Uniforme (0;2) PDU/L	GDWQ, 3rd Edition [1]
C <sub>w_5</sub> (Literatura)	Contaminación viral de aguas superficiales	Uniforme (0,01;10) PDU/L	GDWQ, 3rd Edition [1]
C <sub>w_6</sub> (Literatura)	Contaminación viral de agua potable	Uniforme (0,006;4) PDU/L	Borchard et al, 2012 [4]
T <sub>ap</sub> (Encuesta)	¿Cuánto tiempo transcurre desde la última aplicación hasta la cosecha?	Laplace (30;21,88) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
D (Literatura)	Tasa de decaimiento	Triangular (0,008;0,019;0,039) Log CFU/día Log PDU/día	Danyluk et al, 2011 [5]

Bac_transf (Literatura)	Porcentaje de transferencia bacteriana por cada 0.5 g	Uniforme (0,000081; 0,00011)	Stine et al, 2005 and 2011 [6, 7]
Vir_transf (Literatura)	Porcentaje de transferencia viral por cada 0.5 g	Uniforme (0,021;0,031)	Stine et al, 2005 and 2011 [6, 7]
Prev_hands (Literatura)	Prevalencia de bacterias en la mano de un cosechador	Beta (7;41)	Aceituno et al, 2016 [8]
F_prod (Literatura)	Proporción de transferencia por evento desde el fruto a la mano	Beta (15,64;41,94)	Verhaelen et al, 2013 [9]
W_harv (Literatura)	Superficie de la mano que toca el fruto	2,1 cm <sup>2</sup>	Verhaelen et al, 2013 [9]
W_hand (Literatura)	Superficie total de un lado de una mano	245 cm <sup>2</sup>	USEPA, 2011 [10]
W_prod (Literatura)	Superficie del fruto	Normal (1064;167) mm <sup>2</sup>	Bouwknegt et al, 2015 [12]
F_hand (Literatura)	Proporción de transferencia por evento desde la mano al fruto	Lognormal (-8,34;0,58)	Verhaelen et al, 2013 [9]
C_harv_vir (Literatura)	Número de virus en la mano del cosechador	Gamma (0,14;54,6) PDU/mano	Bouwknegt et al, 2015 [12]
C_harv_bac (Literatura)	Número de bacterias en la mano del cosechador	Uniforme (1;1,9) CFU/cm <sup>2</sup>	Quadros Rodrigues et al, 2014 [11]
transp_time (Encuesta)	¿Cuánto tiempo demora el transporte desde el predio al centro de acopio?	Loglogistic (0,0014937;0,044281;1,70 81) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
transp_temp (Encuesta)	¿A qué temperatura se transportan las frambuesas?	Triangular (11,256;28;28) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas

**Tabla 2** Lista de parámetros, valores y distribuciones usadas en el módulo de acopio de frambuesas frescas.

<i>Parámetro (fuente del dato)</i>	<i>Descripción</i>	<i>Distribución/Unidad</i>	<i>Referencia</i>
Time_cc (Encuesta)	Tiempo promedio que las frambuesas están en el centro de acopio	Triangular (0,041667;0,041667;0,33716) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
Temp_cc (Encuesta)	¿Cuál es la temperatura del centro de acopio?	Valor Extremo (24,3522;5,1304) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
transp_temp (Encuesta)	¿Cuál es la temperatura de transporte?	Triangular (-7,6691;27;27) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
transp_time (Encuesta)	Tiempo que demora el transporte desde el acopio al packing	Exponencial (0,060343) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas

**Tabla 3** Lista de parámetros, valores y distribuciones usadas en el módulo de acopio de frambuesas congeladas.

<i>Parámetro (fuente del dato)</i>	<i>Descripción</i>	<i>Distribución/Unidad</i>	<i>Referencia</i>
Time_cc_frz (Encuesta)	Tiempo promedio que las frambuesas están en el centro de acopio	Uniforme (30;40) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
Temp_cc_frz (Encuesta)	¿Cuál es la temperatura del centro de acopio?	Uniforme (-22,5;-18) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
transp_temp_frz (Encuesta)	¿Cuál es la temperatura de transporte?	Uniforme (-22,5;-20) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
transp_time_frz (Encuesta)	Tiempo que demora el transporte desde el acopio al packing	Uniforme (0,0007;0,0834) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas

**Tabla 4** Lista de parámetros, valores y distribuciones usadas en el packing de frambuesas frescas.

<i>Parámetro (fuente del dato)</i>	<i>Descripción</i>	<i>Distribución/Unidad</i>	<i>Referencia</i>
wait_time_rec (Encuesta)	Tiempo de espera para las frambuesas	Exponencial (0.010305) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
wait_temp_rec (Encuesta)	Temperatura promedio en el área de recepción	Triangular (0.050215,27,27) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
cold_time (Encuesta)	Tiempo que la fruta pasa en la cámara de frío	Triangular (-0,0093158;0,083333;0,56261) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
cold_temp (Encuesta)	Temperatura objetivo en la cámara de frío	Exponencial (0.79688) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
C_food_vir (Literatura)	Número de virus en la mano de un manipulador	Gamma (0.67,1.62) PDU/mano	Bouwknegt et al, 2015 [12]
$\pi_{\text{food}}$ (Lit.Search)	Proporción de la mano del manipulador que toca el fruto	Uniforme (0,1)	Bouwknegt et al, 2015 [12]
C_food_bac (Literatura)	Número de bacterias en las manos del manipulador	Uniforme (1,1.9) CFU/cm <sup>2</sup>	Quadros Rodrigues et al, 2014 [11]
pack_time (Encuesta)	Tiempo transcurrido hasta la salida del packing	Loglogistic (0.0043615,0.0080573,1.7482) días	Ajuste de @Risk de las encuestas
pack_temp (Encuesta)	Temperatura dentro del packing	Logistic (7.6448,1.4959) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
time_transp (Encuesta)	Tiempo que transcurre para llegar a destino.	Pareto (0.77518,0.083333) días	Ajuste de @risk de las encuestas
temp_transp (Encuesta)	Temperatura del camion durante el transporte	Loglogistic (-23.0679,4.6603,4.4384) °C	Ajuste de @risk de las encuestas

**Tabla 5** Lista de parámetros, valores y distribuciones usadas en el packing de frambuesas congeladas.

Parámetro (fuente del dato)	Descripción	Distribución/Unidad	Referencia
wait_time_rec (Encuesta)	Tiempo de espera para las frambuesas	Laplace (0.021,0.0164) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
wait_temp_rec (Encuesta)	Temperatura promedio en el área de recepción	Triangular (0.050215,27,27) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
cold_time (Encuesta)	Tiempo que la fruta pasa en la cámara de frío	Triangular (-0.0093158,0.083333,0.56261) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
cold_temp (Encuesta)	Temperatura objetivo en la cámara de frío	Exponencial (0.79688) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
C_food_vir (Literatura)	Número de virus en la mano de un manipulador	Gamma (0.67,1.62) PDU/mano	Bouwknegt et al, 2015 [12]
C_food_bac (Literatura)	Número de bacterias en las manos del manipulador	Uniforme (1,1.9) CFU/cm <sup>2</sup>	Quadros Rodrigues et al, 2014 [11]
pack_time (Encuesta)	Tiempo transcurrido hasta el congelador	Loglogistic (0.0043615,0.0080573,1.7482) Días	Ajuste de @Risk de las encuestas
$\pi_{\text{food}}$ (Lit.Search)	Proporción de la mano del manipulador que toca el fruto	Uniforme (0,1)	Bouwknegt et al, 2015 [12]

pack_temp (Encuesta)	Temperatura dentro del packing	Logistic (7.6448,1.4959) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
Frz_temp (Encuesta)	Temperatura objetivo en el congelador	Uniforme (-35,-25) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas
Frz_time (Encuesta)	Tiempo que la fruta pasa en el congelador	Gaussian Inversa (16.348,1.3124) días	Ajuste de @Risk de las encuestas
time_transp (Encuesta)	Tiempo que transcurre para llegar a destino.	Pareto (0.77518,0.083333) días	Ajuste de @Risk de las encuestas
temp_transp (Encuesta)	Temperatura del camión durante el transporte	Loglogistic (-23.0679,4.6603,4.4384) °C	Ajuste de @Risk de las encuestas

### Contaminación cruzada durante la cosecha (Módulo productores)

Para evaluar la posible contribución de contaminación debido a las prácticas de cosecha de frambuesa, fue utilizado el modelo Bouwknecht et al. [12]. El número de bacterias o virus por gramo ( $N_{harv}$ ) de frambuesa durante la cosecha se calculó de la siguiente manera:

$$N_{harv} = C_{ph} - f_{prod} \frac{W_{harv}}{W_{prod}} C_{ph} + f_{hand} \frac{W_{harv}}{W_{hand}} C_{hand} \quad (2)$$

Siendo  $F_{hand}$  la proporción de virus transferidos de la mano a las frambuesas. El tamaño de una mano ( $W_{hand}$ ) corresponde a la superficie total de la mano de un cosechador [10],  $W_{harv}$  es el área de la mano que realmente toca las frambuesas. Finalmente,  $C_{hand}$  es la concentración de bacterias o virus en la mano.

### Modelo de crecimiento bacteriano (para todos los módulos)

Uno de los principales efectos en las poblaciones bacterianas es el crecimiento debido al abuso de temperatura y la reducción debido a las prácticas de congelación y enfriamiento. Danyluk y sus colegas [5] estudiaron los parámetros de crecimiento del *E. coli* O157: H7 en verduras de hoja verde y propusieron un modelo de crecimiento. La supervivencia del *E. coli* O157: H7 se estudió también en frutillas en temperaturas de enfriamiento y congelación [13]. En base a los datos extraídos de estas dos publicaciones, las cuales fueron las más similares a esta investigación, se crearon tres modelos basados en la temperatura del proceso: más de 8° C, entre 0° C y 8° C, y por debajo de 0°. Las tablas 6, 7 y 8 indican los parámetros y valores resumidos.

Para las temperaturas de enfriamiento y congelación, se propuso una reducción máxima ( $r_{max}$ ) basada en los datos de Knudsen et al. [13]. Adicionalmente, los primeros días de congelación tienen una reducción más fuerte en las poblaciones bacterianas, por lo que se propusieron dos tasas de reducción diferentes ( $r_1$  y  $r_2$ ) basadas en los tiempos de congelación. Para menos de 8 días, se utilizó  $r_1$  y para más de 8 días, se utilizó  $r_2$ .



**Tabla 6** Parámetros del modelo de crecimiento bacteriano para temperaturas sobre 8°C.

Parámetro ID	Descripción	Ecuación	Valor/Distribución/Cálculo	Unidad
$\mu$	Tasa de crecimiento	$(b*(T-T_0))^2$	-	Log CFU
T	Temperatura de la etapa modelada	-	Vea tablas 4,5,6,7 y 8	°C
$T_0^1$	Constante de temperatura 1	-	2,628	Sqrt (log CFU/day/°C)
$b^1$	Constante de temperatura 2	-	0.0616	°C
t	Tiempo transcurrido en la etapa modelada	-	Vea tablas 4,5,6,7 y 8	Días
$C_i$	Concentración inicial	-	De la etapa anterior	Log CFU/gr
-	Concentración final	$C_i + \mu * t$	-	Log CFU/gr

<sup>1</sup> Ecuaciones y constantes adaptadas de Danyluk et al., 2011 [5].

**Tabla 7** Parámetros del modelo de crecimiento bacteriano para temperaturas entre 0 y 8°C.

Parámetro ID	Descripción	Ecuación	Valor/Distribución/Cálculo	Unidad
$r^1$	Reducción por día	-	0.181	Logs/día
$r_{max}^1$	Reducción máxima	-	1.225	Logs
t	Tiempo transcurrido en la etapa modelada	-	Vea tablas 4,5,6,7 y 8	Días
$C_i$	Concentración inicial	-	De la etapa anterior	Log CFU/gr
-	Concentración final	$C_i - r * t$	-	Log CFU/gr

<sup>1</sup> Ecuaciones y constantes adaptadas de Danyluk et al., 2011 [5].

**Tabla 8** Parámetros del modelo de crecimiento bacteriano para temperaturas bajo 0°C.

Parámetro ID	Descripción	Ecuación	Valor/Distribución/ Cálculo	Unidad
$r_1^a$	Reducción por día, menos de 8 días	-	0,181	Logs/día
$r_2^a$	Reducción por día, más de 8 días	-	1,225	Logs/día
$r_{máx}^a$	Reducción máxima	-	1,6	Logs
t	Tiempo transcurrido en la etapa modelada	-	Vea tablas 4,5,6,7 y 8	Días
Ci	Concentración inicial	-	De la etapa anterior	Log CFU/gr
-	Concentración final	$Ci - r_1 * t$ , si $t < 8$ ó $Ci - r_2 * t$ , si $t > 8$ ó $Ci - r_{máx}$	-	Log CFU/gr

<sup>1</sup> Ecuaciones y constantes adaptadas de Danyluk et al., 2011 [5].

### Contaminación cruzada debido a la manipulación (packing)

Al igual que en el módulo de producción, el modelo de Bouwknecht et al. [12] se usó para la manipulación de frambuesas durante la selección en el packing. El proceso de selección consiste en que los trabajadores manipulan para evaluar su calidad visual. El número de bacterias o virus por gramo ( $n_{touch}$ ) de frambuesa durante el proceso de selección se calculó de la siguiente manera:

$$n_{touch} = C_{cc} - f_{prod} \pi_{food} C_{cc} + f_{hand} \frac{W_{food}}{W_{hand}} C_{food} \quad (3)$$

Siendo  $C_{cc}$  la concentración en la frambuesa después del paso por el centro de acopio.  $C_{food}$  es la concentración de virus o bacterias en las manos del manipulador,  $\pi_{food}$  es la proporción de la mano del manipulador de alimentos tocando el producto y  $W_{food}$  es la superficie de tocado por la mano de un manipulador, la cual es lo mismo que  $W_{harv}$  en la granja.

### Simulación de Monte Carlo

Una vez que se desarrolló el modelo, se realizó la simulación de Monte Carlo utilizando muestreo de Hipercubo Latino con 10.000 iteraciones para obtener estimaciones estocásticas de las variables de

salida, es decir, cargas de contaminación bacteriana y viral tanto en productos de frambuesa fresca como congelada, utilizando Microsoft Excel® add-on package @Risk (version 7.0, Palisade Corporation, New York, USA).

#### Análisis de escenarios

La eficacia de las intervenciones de control microbiano que pueden ser potencialmente adoptadas en diferentes puntos a lo largo de la cadena de suministro de la frambuesa fue evaluada a través de un análisis de escenarios. Un total de 13 escenarios se evaluaron en el modelo, incluyendo un escenario de referencia con fines comparativos utilizando los datos mencionados anteriormente para la estimación del escenario "sin intervención" y otros 10 escenarios alternativos para predecir la reducción en la contaminación si cierta tecnología o regulación específica fuese adoptada. Para cada escenario, el modelo se ejecutó para 10,000 iteraciones para generar las estimaciones de riesgo promedio. Todos los análisis de escenarios se realizaron en frambuesas frescas. Las tablas 9 a la 12 indican los escenarios evaluados para intervenciones en agua.

**Tabla 9** Escenario análisis contaminación bacteriana según uso de agua.

Escenarios	Contaminación del agua	Tipo de Agua			Cambios tipo de agua
		Ocurrencia de uso agua de pozo (GW)	Ocurrencia uso agua de superficie (SW)	Ocurrencia de uso de agua potable (PW)	
Basal	Contaminación como actual	71%	15%	14%	Ocurrencia actual
A	Sin intervención	86%	0%	14%	100% SW→GW
B	Sin intervención	42%	8%	50%	50% SW → GW & 50% GW → PW
C	Sin intervención	5%	5%	90%	GW&SW→PW
D	Intervención con luz UV	71%	15%	14%	Ocurrencia actual
A+D	Intervención con luz UV	86%	0%	14%	100% SW→GW
B+D	Intervención con luz UV	42%	8%	50%	50% SW → GW & 50% GW → PW

**Tabla 10** Escenarios de contaminación bacteriana con reducción de tiempos de transporte.

Escenarios	Tiempo de transporte desde predio al centro de acopio	Tiempo de transporte desde el centro de acopio al packing
Basal	0-9 horas	0,5-8 horas
E	1 hora	Basal
F	Basal	1 hora
E+F	1 hora	1 hora

**Tabla 11** Escenarios de reducción de temperatura en centro de recolección

Scenario	Temperatura en el Centro de Recolección
Basal	0.5-30 °C
G	50 % de reducción
H	4-8 °C (Sistema de refrigeración totalmente implementado)

**Tabla 12** Escenario tiempo de aplicación de pesticidas

Escenario	Tiempo entre la última aplicación de pesticida y la cosecha
Basal	0-120 días
I	25% de incremento
J	50% de incremento

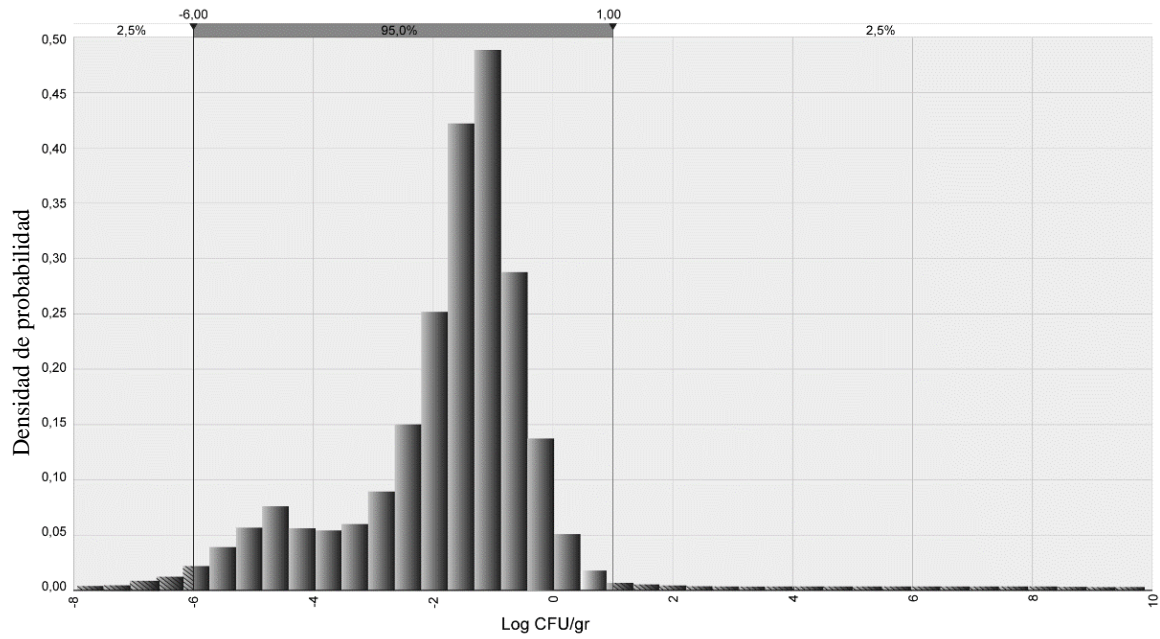
Estudios previos muestran que el agua es una de las principales fuentes de contaminación para las bayas y las verduras de hoja verde [14, 15]. En la encuesta de prácticas a los productores, en Chile, las fuentes de agua consideradas para las aplicaciones de plaguicidas son tres, en orden decreciente de limpieza; agua potable, aguas de pozo y aguas superficiales. Por lo tanto, una de las intervenciones simuladas en este estudio fue cambiar los usos en la frecuencia de distintos tipos de agua.

Los cambios en las fuentes de agua se modelaron a través del incremento de frecuencia de uso de agua potable y/o aguas de pozo en el modelo. Para controlar las cargas microbianas en las fuentes de agua, la introducción de luz ultravioleta fue evaluada, porque se ha demostrado que las lámparas ultravioletas son fáciles de instalar y operan a un costo relativamente bajo y no crean subproductos perjudiciales [16]. Se ha demostrado que la luz ultravioleta reduce la contaminación bacteriana y viral en el agua en 2-4 logs [16,17]. Las combinaciones de las dos intervenciones en el agua también fueron evaluadas. Se calcularon los cambios relativos en las estimaciones de riesgo promedio de cada escenario, en comparación con el escenario de referencia.

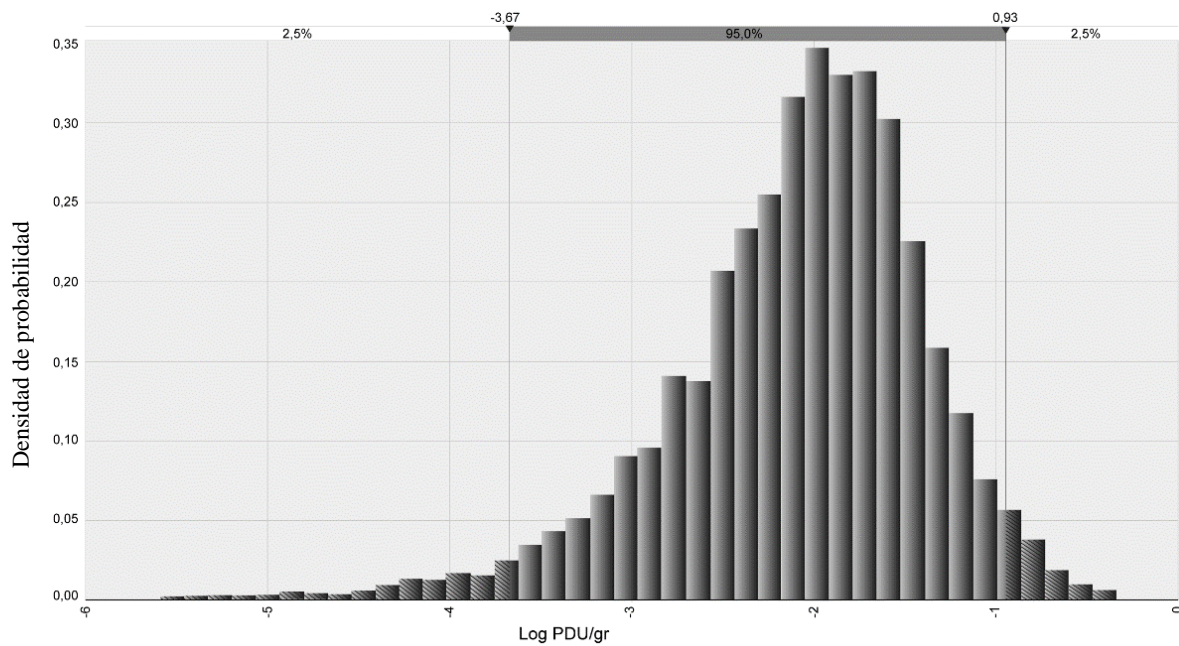
#### **D. Resultados y discusión**

##### *Estimaciones de riesgo de las prácticas actuales*

Las figuras 3 y 4 muestran la distribución de la contaminación al final del proceso para frambuesas frescas para *E. coli* y Hepatitis A, respectivamente. La contaminación bacteriana para las frambuesas congeladas se muestra en la Figura 5. No se muestran los datos de contaminación viral en la cadena congelada porque los únicos parámetros modificados son las prácticas de congelación, las cuales no afectan a las poblaciones de virus.

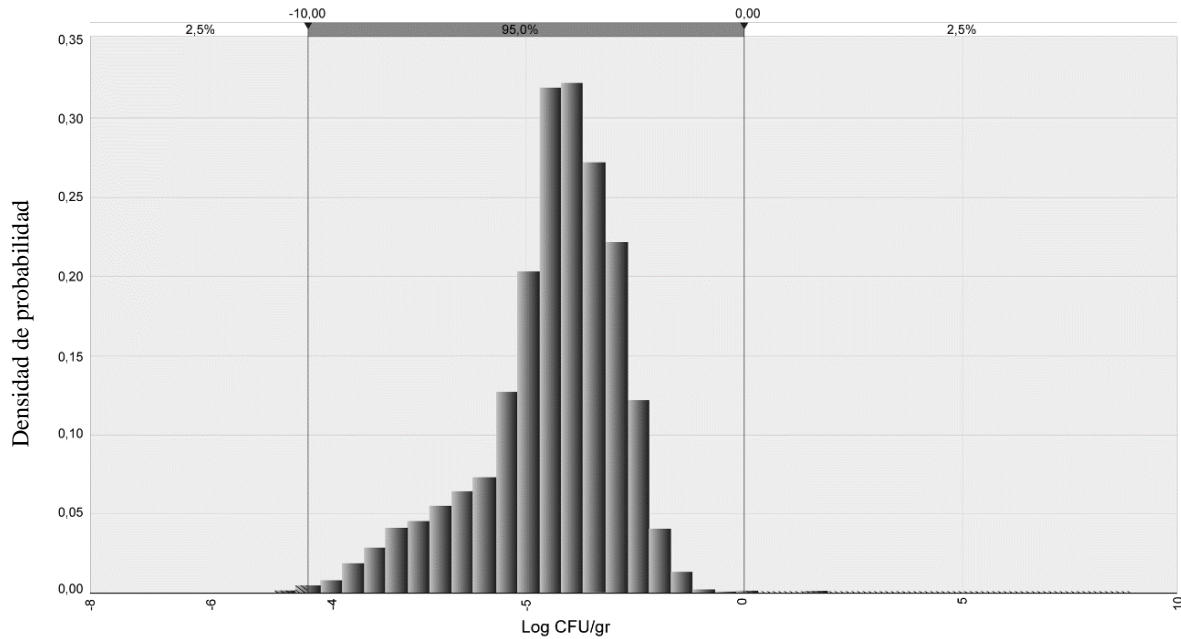


**Figura 3** Distribución de contaminación con *E. coli* para frambuesas frescas.



**Figura 4** Distribución de contaminación con Hepatitis A para frambuesas frescas.

Para las frambuesas frescas, la contaminación bacteriana fue de -1,89 log CFU/g. La mayoría de los resultados (intervalo de probabilidad del 95%) para 10.000 iteraciones oscilaron entre -5,48 y 0,13 log CFU/g con el valor máximo sobre 8 registros. La contaminación media para las frambuesas congeladas fue de -4,44 log CFU/g. La contaminación viral media para las frambuesas frescas fue de -2,07 log PDU/gr. La mayoría de los resultados (intervalo de probabilidad del 95%) para 10.000 iteraciones oscilaron entre -3,67 y - 0,93 log PDU/gr con un valor máximo de 0,03 log PDU/g.

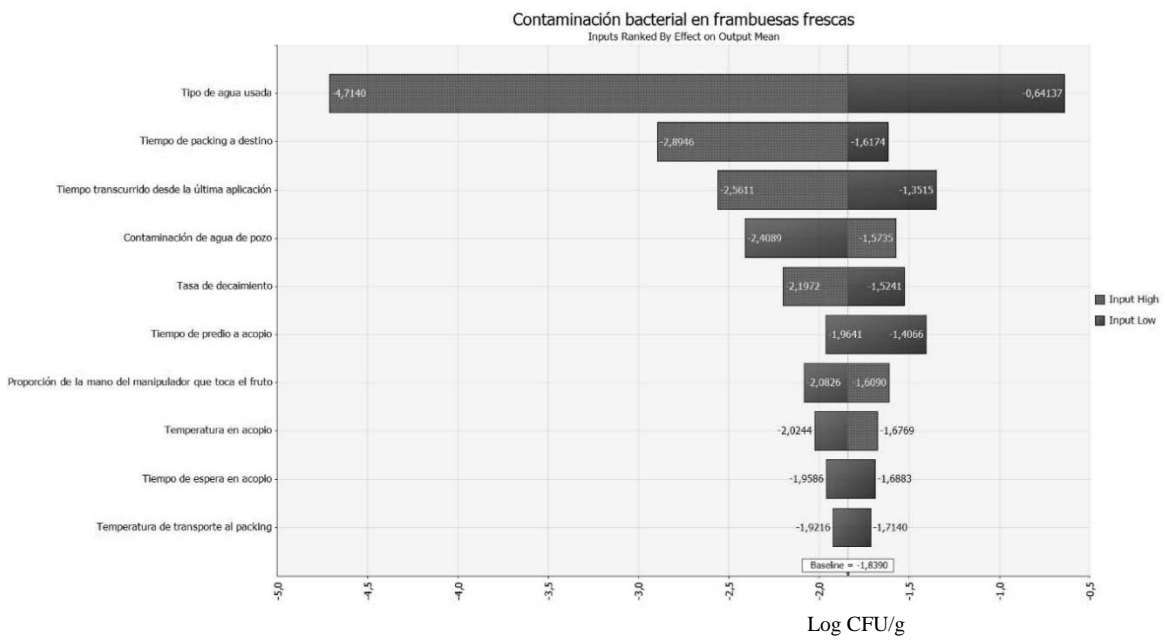


**Figura 5** Distribución de contaminación bacteriana para frambuesas congeladas.

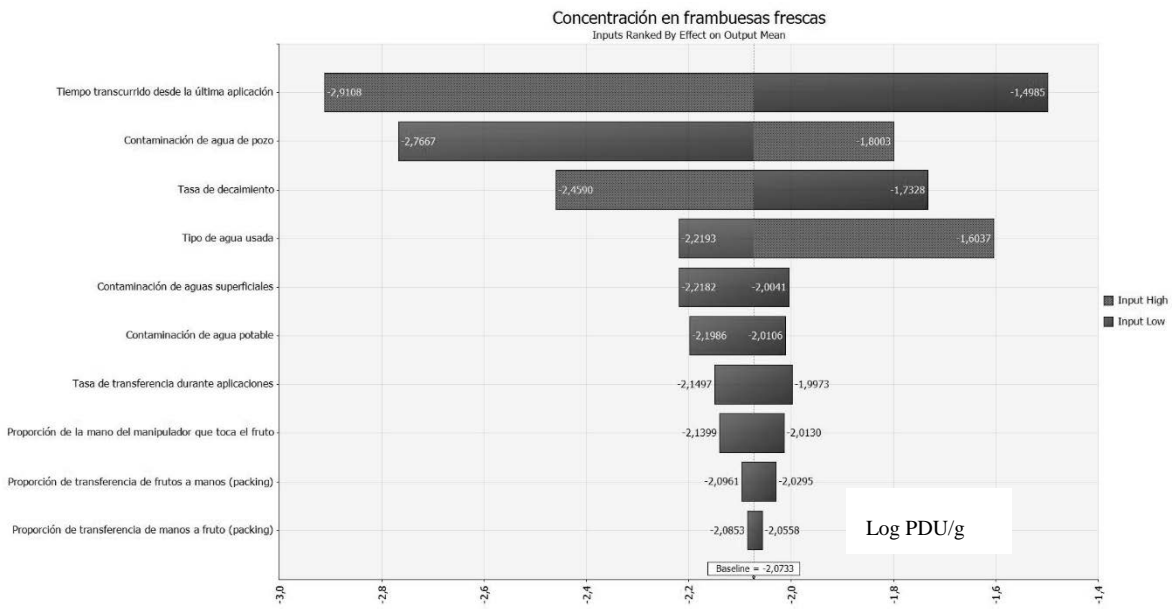
### Análisis de sensibilidad

Los diagramas de tornado que se muestran en las figuras 6, 7 y 8 indican las entradas que tienen el mayor impacto en las simulaciones. Para la contaminación bacteriana en la cadena de frambuesas frescas, las tres entradas que más afectan los resultados son el tipo de agua utilizada, los tiempos de transporte al packing y el tiempo transcurrido después de la última aplicación de pesticidas. Para la contaminación viral en la cadena de frambuesas frescas, las tres entradas que más afectan los resultados son el tiempo transcurrido después de la última aplicación, la contaminación de las aguas de pozo y la tasa de decaimiento. Finalmente, para la cadena de suministro de frambuesa congelada, los parámetros más importantes son el tipo de agua utilizada, los tiempos de congelación y el tiempo de transporte al packing.

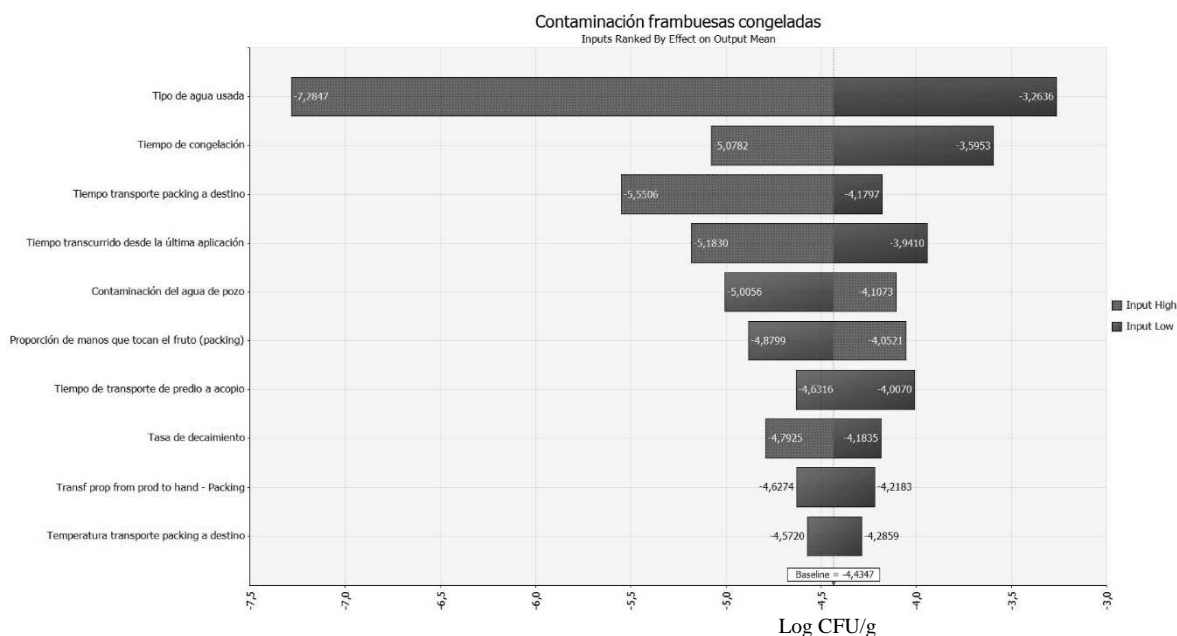




**Figura 6** Análisis de sensibilidad de la contaminación bacteriana en frambuesas frescas.



**Figura 7** Análisis de sensibilidad de la contaminación viral en frambuesas frescas



**Figura 8** Análisis de sensibilidad de la contaminación bacteriana en frambuesas congeladas.

En todas las simulaciones de Monte Carlo para cada conjunto de datos, uno de los parámetros significativos recurrentes es el agua utilizada para las aplicaciones de pesticidas. Esto es intuitivo ya que varios informes habían indicado que el agua es uno de los principales vehículos de contaminación de productos frescos [18], especialmente en el caso del agua utilizada para aplicaciones de plaguicidas [18,19,20]. Inicialmente, también se consideró el agua de riego, pero luego se descartó, de acuerdo con una breve consulta de expertos, a causa de la imposibilidad de cosechar la frambuesa debido al deterioro fúngico asociado con este evento.

Las prácticas de congelación en la cámara de congelación y el transporte desde el centro de acopio también son significantes en las salidas, ya que temperaturas muy bajas y períodos prolongados de tiempo reducen significativamente la carga bacteriana [13].

Como se ve en la Figura 8, el tiempo transcurrido después de la última aplicación, la contaminación del agua de pozo y la tasa de decaimiento -todos datos relacionados con aplicación de pesticidas- tienen el mayor impacto en las concentraciones virales. Esto se debe principalmente al hecho de que esta etapa es la única fuente de entrada para la contaminación viral en este modelo.

La manipulación del cosechador y las manos del manipulador no se muestran en la simulación como un factor significativo. Debido a la falta de datos, los datos de prevalencia no se consideraron, aunque es un parámetro muy importante por estudiar cuando se evalúa el impacto de la contaminación cruzada. Esto último es especialmente importante porque con el modelo y los datos recolectados de diferentes autores [7, 8, 12] el efecto neto de tocar una frambuesa es una transferencia de contaminación de la frambuesa a la mano, en lugar de la dirección opuesta, como se podría pensar.

Todos los resultados están dentro de un rango bajo, la cadena de frambuesa fresca es la que tiene los recuentos más altos de *E. coli*. Esto se debe a que en la cadena de frambuesa fresca hay más períodos de espera con temperaturas más altas. Sin embargo, esto último no se ve en el diagrama de tornado en la Figura 6, donde uno esperaría que estos tiempos y temperaturas tuvieran efectos más marcados en las estimaciones. Esto podría deberse a las incertidumbres asociadas a los datos de contaminación del agua y la tasa de transferencias a la fruta producto de las aplicaciones de pesticidas.

Existen incertidumbres significativas en el modelo las cuales se clasifican en dos categorías: 1) datos no locales y 2) datos no optimizados. El primero se refiere a la necesidad de utilizar datos que no se hayan creado a partir de fuentes chilenas, como la contaminación del agua y la contaminación en las manos del manipulador. La segunda clase se refiere a los datos que se recopilaron de otros modelos y usos. Entre otras, las tasas de transferencia propuestas por Stine et al [6] estaban destinadas a la lechuga y no a las frambuesas, por lo tanto, esta es una importante limitación del modelo.

La recopilación de datos en términos de reducción de incertidumbre y de incluir datos más cercanos nuestra matriz alimenticia es invaluable para mejorar la calidad de las estimaciones de riesgo.

#### Análisis de escenarios y evaluación de intervenciones

La Tabla 13 resume los resultados de los diferentes análisis de escenarios. Para los Escenarios A-C, cambiar la frecuencia del tipo de agua en uso tuvo un fuerte impacto en las poblaciones bacterianas, pero no en las poblaciones de virus. El aumento del uso de agua potable redujo las poblaciones bacterianas en 66,35% y 136,96% para los escenarios B y C, respectivamente. Las poblaciones virales se vieron ligeramente afectadas por los cambios en la frecuencia de uso de las fuentes de agua. El uso de lámparas UV tuvo un efecto mucho más marcado, reduciendo las poblaciones de bacterias a un nivel similar que cuando se usa principalmente agua potable (Escenario C). Todos los escenarios con la lámpara UV tienen al menos un 100% de reducción logarítmica en poblaciones bacterianas y un 50% en virales. Los escenarios E y F tuvieron poco efecto en las simulaciones, resultando en reducciones menores al 6% en cada uno de los casos. Como se ve en la Tabla 13, aumentar la frecuencia del uso de agua potable (Escenario C) es muy efectivo para las poblaciones de bacterias,

pero no para los virus. El pequeño aumento en los virus puede deberse a la falta de datos para el agua potable; los pocos datos recopilados por Borchard et al. [4], describen concentraciones ligeramente más altas en comparación con las estimaciones mundiales de la OMS para las aguas de pozo [1].

Por otro lado, la intervención propuesta con luces ultravioleta indica una reducción significativa tanto en poblaciones bacterianas como virales. Como se muestra en la Tabla 13, la reducción logarítmica lograda por esta tecnología (Escenario D) para bacterias y virus es de hasta 133% y 159%, respectivamente. El efecto sobre los virus es mayor probablemente porque no hay más etapas de crecimiento como sí lo hay en las bacterias.

La combinación de lámparas UV y el aumento del uso de agua potable (Escenarios A+D y B+D) no parecen proporcionar una reducción adicional considerable, especialmente considerando que las aguas de pozo están aumentando los conteos de virus (Escenarios B y C).

#### Identificación de falta de datos

Se eliminaron varias rutas de contaminación debido a la falta de modelos disponibles para conectar los datos chilenos -principalmente sobre la frecuencia de uso- o la inexistencia de datos de prevalencia y concentración de los microorganismos seleccionados en frambuesas, así como datos específicos sobre la contaminación del agua y la tasa de descomposición en Chile (Danyluk et al [5] fue el único autor que propuso una estimación utilizable, aunque en espinaca para un sustituto de E. coli). La tasa de transferencia utilizada se estimó en la lechuga, debido a la falta de estudios realizados en frambuesas; datos de investigación experimental [6] fueron tomados y aplicados.

Es necesario aumentar los datos disponibles, no solo desde una perspectiva experimental sino también desde una observacional, en materia de información de acceso libre y la creación de sistemas de vigilancia continua que proporcionen estos tipos de datos a los investigadores. Las colaboraciones Academia-Gobierno son útiles para lograr este objetivo, como se muestra en este estudio para algunos conjuntos de datos.

**Tabla 13** Resumen de los resultados del análisis de escenarios.

Escenario	Contaminación media (log CFU/g o log PDU/g)	% de cambio comparado con la línea base
Bacteriana	-1,84	
Viral	-2,07	-
<i>(Línea base)</i>		
A	-2,01 -2,18	9,24% reducción 5,31% reducción
B	-3,06 -2,01	66,30% reducción 2,89% aumento
C	-4,36 -1,91	136,96% reducción 7,73% aumento
D	-4,29 -3,29	133,15% reducción 158,94% reducción
A+D	-5,41 -3,21	194,02% reducción 55,07% reducción
B+D	-4,30 -3,31	133,7% reducción 59,9% reducción
E <i>(Solo bacteriana)</i>	-1,90	3,26% reducción
F <i>(Solo bacteriana)</i>	-1,88	2,17% reducción
E+F <i>(Solo bacteriana)</i>	-1,94	5,43% reducción
G <i>(Solo bacteriana)</i>	-1,99	8,15% reducción
H <i>(Solo bacteriana)</i>	-2,03	10,33% reducción
I	-1,99 -2,26	8,15% reducción 9,18% reducción
J	-2,15 -2,44	16,85% reducción 17,87% reducción

### Discusión

La evaluación de riesgos es una herramienta que se ha utilizado desde hace ya varios años. Es un proceso muy bien estructurado que considera las limitaciones en los datos y proporciona información fácil de entender para los gestores de riesgo. Aunque el proceso en sí requiere experiencia científica,

es allí cuando las alianzas estratégicas, como las colaboraciones entre Academia y Gobierno, son más útiles.

En este proyecto particular de evaluación de riesgos los principales hallazgos desde la perspectiva de los gestores de riesgo son:

- La calidad del agua usada en las aplicaciones de plaguicidas debe mejorarse ya que es el principal contribuyente de contaminación en frambuesas;
- Con los datos recopilados, la contaminación en general de las frambuesas es baja;
- Es relativamente barato y fácil el uso de tecnologías como la aplicación de luz ultravioleta, que proporcionan una importante reducción en la contaminación.

El uso de la evaluación de riesgos proporciona información crítica cuando existe carencia de información. Es necesario realizar más investigaciones en las fuentes de agua, la transferencia de contaminación específicamente en la frambuesa debida a los desechos de animales y la prevalencia de bacterias y virus en las instalaciones de operación de alimentos, entre otros.

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos fue el de pilotar la experiencia en colaboración entre la Academia y ACHIPIA. En general la comunicación fue expedita y simple. Tener un estudiante en UNL hizo que la información fluyera de manera muy rápida, lo que destaca la importancia de tener interlocutores con experiencia en este tipo de colaboraciones. ACHIPIA como coordinador de las actividades, apoyando al SAG en la gestión de las encuestas, en la traducción y procesamiento en conjunto con la UNL. Debido a la naturaleza de las actividades del SAG, el rol de ACHIPIA como coordinador fue fundamental para lograr los objetivos del proyecto, especialmente lo que guarda relación con las solicitudes de información desde UNL a SAG.

Respecto a los resultados del modelo, no se encontraron datos para comparar los resultados de contaminación en frambuesa por hepatitis A y *E. coli*, con la prevalencia inicial observada en Chile. Sin embargo, un estudio realizado en Canadá no encontró contaminación por *E. coli* en el grupo de bayas vendidas al por menor (por ejemplo, arándanos, fresas, moras, frambuesas, entre otras) en más de 1.373 muestras las cuales incluían productos importados y nacionales [21]. Extendiendo esta comparación a las frutillas, Johannessen *et al.* encontró en la producción primaria de frutillas en Noruega 1/80 muestras positivas para *E. coli* con una concentración de 1 log<sub>10</sub> CFU/g [22].

La Regulación Sanitaria de Alimentos de Chile (RSA) establece los niveles máximos de *E. coli* encontrados en fresco ( $10^2$  -  $10^3$  CFU/g, n=5, c=2) y frutas congeladas ( $10$  -  $10^2$  CFU/g, n=5, c=2) [23] y de esta manera pudimos confirmar que la concentración de *E. coli* encontrada en nuestro

estudio (-5,48-0,13 log UFC/g, intervalo de probabilidad del 95%) se mantuvo dentro del rango admitido establecido por la legislación chilena. Dado que el RSA no menciona la contaminación por hepatitis A [23], no pudimos compararlo con la concentración calculada de hepatitis A. Un estudio realizado en cuatro países europeos (República Checa, Finlandia, Polonia y Serbia) no detectó contaminación por virus de hepatitis A en frambuesas frescas (0/60) o en congeladas (0/39) [24]. Sin embargo, el tamaño de muestra de este estudio es restringido y la detección podría verse afectada por las limitaciones asociadas con las metodologías de testeo, como las limitaciones de la extracción de ARN viral y los bajos niveles de virus en alimentos y agua contaminados [25].

## **E. Conclusiones**

Esta alianza estratégica con la Academia ha permitido acercar el conocimiento científico a las tareas de los gestores del riesgo en Chile. Consideramos que, si bien el desarrollo de este piloto de estudio ha revelado una falta de datos locales y pertinentes a los alimentos en estudio, se ha demostrado que la contaminación es baja y que es posible identificar cuáles son las fuentes o factores que influyen de mayor manera en la contaminación de los alimentos, para focalizar los recursos y mejorar los actuales programas de control y vigilancia. Adicionalmente, las metodologías actuales en evaluación de riesgos permiten evaluar *in silico* intervenciones que de otra forma habría que salir a terreno a comprobar su eficacia, incurriendo en gastos innecesarios. De esta forma, la evaluación de riesgos no solo permite estudiar los riesgos asociados a la producción de alimentos, sino que además ayuda a identificar donde están los problemas y, a su vez, proponer alternativas para mitigar estos riesgos.

Este modelo de trabajo es extensible a otras matrices de alimentos y peligros, por lo que se podría implementar a otros estudios tendientes a conocer más a fondo la situación de la inocuidad de nuestros alimentos y proveer de más información con base científica a los gestores del riesgo. Todo esto con el objetivo de fortalecer el Sistema Nacional de Inocuidad y Calidad Alimentaria para proveer de alimentos seguros y saludables.

## F. Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2008.
2. Schets FM, van Wijnen JH, Schijven JF, Schoon H, de Roda Husman AM. Monitoring of Waterborne Pathogens in Surface Waters in Amsterdam, The Netherlands, and the Potential Health Risk Associated with Exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in These Waters. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Feb 15;74(7):2069–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01609-07>
3. [Potable Water, Part 1: Requirements] Chilean Standard 409/1 Of.2005. Chilean National Institute for Standardization. (Jul. 26, 2005).
4. Borchardt MA, Spencer SK, Kieke BA, Lambertini E, Loge FJ. Viruses in nondisinfected drinking water from municipal wells and community incidence of acute gastrointestinal illness. *Environ Health Perspect.* 2012;120(9):1272-9. doi: 10.1289/ehp.1104499
5. Danyluk MD, Schaffner DW. Quantitative assessment of the microbial risk of leafy greens from farm to consumption: preliminary framework, data, and risk estimates. *J Food Prot.* 2011 May;74(5):700–8. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-10-373
6. Stine SW, Song I, Choi CY, Gerba CP. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *J Food Prot.* 2005 Jul;68(7):1352–8. doi: 10.4315/0362-028X-68.7.1352
7. Stine SW, Song I, Choi CY, Gerba CP. Application of pesticide sprays to fresh produce: a risk assessment for hepatitis A and *Salmonella*. *Food Environ Virol.* 2011 May 20;3(2):86–91. doi: 10.1007/s12560-011-9061-x
8. Fabiszewski de Aceituno A, Heredia N, Stern A, Bartz FE, Venegas F, Solís-Soto L, et al. Efficacy of two hygiene methods to reduce soil and microbial contamination on farmworker hands during harvest. *Food Control.* 2016 Jan;59:787–92. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.059
9. Verhaelen K, Bouwknecht M, Rutjes SA, de Roda Husman AM. Persistence of human norovirus in reconstituted pesticides — Pesticide application as a possible source of viruses in fresh produce chains. *Int J Food Microbiol.* 2013 Jan;160(3):323–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.007



10. U.S. EPA. Exposure Factors Handbook 2011 Edition (Final Report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-09/052F, 2011. Available from: <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=236252>
11. de Quadros Rodrigues R, Loiko MR, Minéia Daniel de Paula C, Hessel CT, Jacxsens L, Uyttendaele M, et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control*. 2014 Aug;42:152-64. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.01.043
12. Bouwknecht M, Verhaelen K, Rzeżutka A, Kozyra I, Maunula L, von Bonsdorff C-H, et al. Quantitative farm-to-fork risk assessment model for norovirus and hepatitis A virus in European leafy green vegetable and berry fruit supply chains. *Int J Food Microbiol*. 2015 Apr;198:50–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.013
13. Knudsen DM, Yamamoto SA, Harris LJ. Survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh and frozen strawberries. *J Food Prot*. 2001 Oct;64(10):1483–8. doi: 10.4315/0362-028X-64.10.1483
14. Bern C, Hernandez B, Lopez MB, Arrowood MJ, de Mejia MA, de Merida AM, et al. Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *Emerg Infect Dis*. 1999 Dec;5(6):766–74. doi: 10.3201/eid0506.990604
15. Petterson SR, Teunis PFM, Ashbolt NJ. Modeling virus inactivation on salad crops using microbial count data. *Risk Anal*. 2001 Dec;21(6):1097–108. doi: 10.1111/0272-4332.216178
16. Massé DI, Masse L, Topp E, Séguin G, Ortega LM, Scott A, et al. Maintenance strategies for on-site water disinfection by ultraviolet lamps on dairy farms. *Water Quality Research Journal of Canada*. 2011 Feb;46(1):2. doi:10.2166/wqrjc.2011.014
17. Chang JC, Ossoff SF, Lobe DC, Dorfman MH, Dumais CM, Qualls RG, et al. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 1985 Jun;49(6):1361-5.
18. Herwaldt BL, Ackers ML. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. The *Cyclospora* Working Group. *N Engl J Med*. 1997 May 29;336(22):1548-56. doi: 10.1056/NEJM199705293362202

19. Cáceres et al. 1998 Cáceres VM, Ball RT, Somerfeldt SA, Mackey RL, Nichols SE, MacKenzie WR, et al. A foodborne outbreak of cyclosporiasis caused by imported raspberries. *J Fam Pract.* 1998 Sep;47(3):231-4. PubMed PMID: 9752377.
20. Herwaldt BL, Beach MJ. The return of Cyclospora in 1997: another outbreak of cyclosporiasis in North America associated with imported raspberries. Cyclospora Working Group. *Ann Intern Med.* 1999 Feb 2;130(3):210-20. PubMed PMID: 10049199.
21. Denis N, Zhang H, Leroux A, Trudel R, Bietlot H. Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. *Food Control.* 2016 Sep;67:225–34. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.02.047
22. Johannessen G, Eckner K, Heiberg N, Monshaugen M, Begum M, Økland M, et al. Occurrence of Escherichia coli, Campylobacter, Salmonella and Shiga-Toxin Producing E. coli in Norwegian Primary Strawberry Production. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [Internet]. 2015 Jun 17;12(6):6919–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph120606919>
23. [Approves Food Sanitary Regulation] Supreme Decree 977/1996. Chilean National Congress Library. (Aug. 06, 1996). Available from: <https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=71271>
24. Maunula L, Kaupke A, Vasickova P, Söderberg K, Kozyra I, Lazic S, et al. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int J Food Microbiol.* 2013 Oct;167(2):177–85. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.003
25. Food Standards Australia New Zealand. Imported food risk statement Ready-to-eat berries and hepatitis A virus. Available from: <http://www.foodstandards.gov.au/publications/Pages/Imported-food-risk-statement-ready-to-eat-berries.aspx>

-0-