

ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE CALIDAD DE DOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE NOPAL VERDURA (*Opuntia* sp.)

ESTIMATION OF QUALITY LEVEL IN TWO PRODUCTION SYSTEMS OF CACTUS LEAVES (*Opuntia* sp.)

T. Olivia **Martínez-Martínez**¹, M. Elva **Ramírez-Guzmán**², Socorro **Anaya-Rosales**³,
M. Lourdes **Arévalo-Galarza**⁴, Gabriel **Leyva-Ruelas**⁵

¹Programa de Inocuidad de Alimentos. Campo Experimental Bajío. INIFAP. km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende 38110, Celaya, Guanajuato, (martinez.talina@inifap.gob.mx). ²Estadística, ³Entomología y Acarología, ⁴Fruticultura. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ⁵Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 56230.

RESUMEN

Para el análisis microbiológico de nopal verdura (*Opuntia* spp.) no hay esquemas de muestreo para diferentes niveles de protección, ni la cuantificación del nivel de calidad del producto, así como una comparación estadística del nivel de protección para el consumidor entre un sistema de producción bajo el sistema de reducción de riesgos de contaminación (SRRC) y bajo el sistema tradicional (ST). Por tanto, en este estudio se determinó el nivel de calidad de un sistema de producción de nopal con SRRC y de un ST, tomando como referencia un estudio observacional. Se estimó el nivel de protección para el consumidor con base en los tamaños de muestra estipulados en los planes de muestreo de la ICMSF (2002) y el nivel de calidad aceptable (NCA) para diferentes niveles de protección en planes de muestreo de dos y tres clases. Finalmente, mediante simulación Montecarlo y distribución Pert, se comparó el nivel de protección que tiene el consumidor al adquirir producto de unidades de producción con SRRC y con ST. Se estimó que 85 y 40 % de cajas de nopal de las unidades de producción con SRRC y ST cumplieron con las especificaciones microbiológicas aceptables. Para los sistemas con SRRC los niveles de protección fueron 38.5 a 96.1 % para tamaños de muestra tradicionales (3 a 20 kg). Se proporcionan nueve esquemas de muestreo con niveles de protección de 80, 90 y 99 %, en los cuales se define el mínimo NCA. La simulación Montecarlo indicó que las unidades con SRRC proporcionan mayor protección desde el nivel de 40 %. Así, planes de muestreo de dos y tres clases permiten diseñar esquemas con un nivel de protección requerido y comparar

ABSTRACT

For the microbiological analysis of cactus leaves (*Opuntia* spp.) there are no sampling plans for different protection levels, nor the quantification of the quality level of the product, or a statistical comparison of the consumer protection level between a production system under contamination risk reduction (CRRS) and under the traditional system (TS). Therefore, in this study the quality level was determined of a cactus leaf production system with CRRS and of TS taking an observational study as reference. The consumer protection level was estimated based on the sample sizes stipulated in sampling plans of the ICMSF (2002) and the acceptable quality level (AQL) for different protection levels in sampling plans of two and three classes. Finally, through Montecarlo simulation and Pert distribution, a comparison was made of the protection level of the consumer when buying a product of production units with CRRS and TS. It was estimated that 85 % and 40 % of boxes of cactus leaves with CRRS and TS complied with the acceptable microbiological specifications. For the systems with CRRS the protection levels were between 38.5 and 96.1 % for traditional sample sizes (3 to 20 kg). Nine sampling plans were provided with protection levels of 80, 90 and 99 %, in which the minimum AQL is defined. The Montecarlo simulation indicated that the units with CRRS provide higher protection starting with the protection level of 40 %. Sampling plans of two and three classes make it possible to design sampling plans with a required protection level and to compare statistically different production systems of cactus leaves.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: November, 2011. Aprobado: August, 2012.

Publicado como ARTICLE en *Agrociencia* 46: 567-578. 2012.

Key words: cactus leaves, acceptance sampling, Pert distribution, Montecarlo simulation.

estadísticamente diferentes sistemas de producción de nopal verdura.

Palabras clave: nopal, muestreo de aceptación, distribución Pert, simulación Montecarlo.

INTRODUCCIÓN

El nopal verdura (*Opuntia* spp.) es una hortaliza que adquirió importancia en el mercado de exportación, principalmente a EE.UU., el cual aumentó su importación en 128.6 % entre 2000 y 2005. Este comportamiento se atribuye al aumento de la población latina y aceptación de la comida mexicana en ese país (Callejas *et al.*, 2006). Por lo tanto, los productores mexicanos adoptan las regulaciones comerciales y sistemas de producción establecidos por los países consumidores, como los programas de inocuidad de alimentos, que disminuyen el riesgo de contaminación de nopal verdura por patógenos como *Salmonella* (CDC, 2008; García-Gómez *et al.*, 2002) y *Escherichia coli* (Nguyen-the y Carlin, 2004). Estos microorganismos están asociados a enfermedades gastrointestinales por el consumo de hortalizas frescas (Johnston *et al.*, 2006).

En México, la Ley Federal de Sanidad Vegetal se modificó en el 2007 con el propósito de tipificar como delito los actos que ponen en riesgo la salud humana; en el Artículo 47 se establece la implementación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC) en la producción primaria de vegetales (DOF, 2007). Gorris (2006) señala que la implementación de los SRRC previene la introducción de factores de contaminación a lo largo de la cadena de producción de alimentos y el cumplimiento de los niveles de protección establecidos por el consumidor. Para la validación y verificación de esos procedimientos se emplean los criterios microbiológicos (CM), que incluyen el grupo del alimento, los microorganismos de interés o productos de su metabolismo, el plan de muestreo y los límites microbiológicos aceptables (Whiting *et al.*, 2006; ANMAT, 2005). La ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2002), establece los planes de muestreo y los límites microbiológicos aceptables, en México para hortalizas frescas, estos límites estaban incluidos en la NOM-093-SSA1-1994, sin embargo, a partir del primero de diciembre de 2010 fue sustituida por la NOM-251-SSA1-2009 que omite este

INTRODUCTION

Cactus leaf (*Opuntia* spp.) is a vegetable that acquired importance in the exportation market, principally to the U.S., which increased its importation by 128.6 % from 2000-2005. This behavior is attributed to the increase of the Latin population and the acceptance of Mexican food (Callejas *et al.*, 2006). Therefore, the Mexican producers adopt the commercial regulations and production systems established by the consumer countries, such as the food safety programs, which reduce the risk of contamination of cactus leaves by pathogens such as *Salmonella* (CDC, 2008; García-Gómez *et al.*, 2002) and *Escherichia coli* (Nguyen-the and Carlin, 2004). These microorganisms are associated with gastrointestinal diseases from the consumption of fresh vegetables (Johnston *et al.*, 2006).

In México, the Federal Plant Safety Law (Ley Federal de Sanidad Vegetal) was modified in 2007 with the purpose of typifying as a crime the acts that put human health at risk; Article 47 establishes the implementation of contamination risk reduction systems (CRRS) in the primary production of vegetables (DOF, 2007). Gorris (2006) points out that the implementation of the CRRS prevents the introduction of contamination risks throughout the food production chain and the compliance of the protection levels established by the consumer. For the validations and verifications of these procedures, microbiological criteria (MC) are used, which include the food group, the microorganisms of interest or products of their metabolism, the sampling plan and the acceptable microbiological limits (Whiting *et al.*, 2006; ANMAT, 2005). The ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2002) establishes the sampling plans and the acceptable microbiological limits. In Mexico, for fresh vegetables, these limits were included in the NOM-251-093-SSA1-1994, however, after the first of December of 2010 it was substituted by NOM-251-SSA1-2009 which omits this section (SSA, 1995a; SSA, 2010). This shows the need to establish microbiological specifications in samples of fresh horticultural products, because in other foods such as milk, cheese, seafood, meat and baked products there are microbiological limits established in official norms that indicate a greater control in the production processes (Fernández-Escartin, 2008).

apartado (SSA, 1995a; SSA, 2010). Esto muestra la necesidad de establecer especificaciones microbiológicas en muestras de productos hortofrutícolas frescos; ya que, en otros alimentos, como leche, queso, productos del mar, carne y productos de panificación, existen límites microbiológicos establecidos en normas oficiales que indican un mejor control en los procesos de producción (Fernández-Escartin, 2008).

Schothorst *et al.* (2009) enfatizan el uso correcto de los planes de muestreo para determinar los CM de forma efectiva y práctica. Al respecto, la ICMSE (2002) sugiere planes de muestreo diseñados de acuerdo con el riesgo del patógeno, el tipo de alimento, las condiciones de manejo y la población a la que va dirigido. Esos planes se clasifican en 15 casos en función de las combinaciones de riesgo a la salud y las condiciones de uso. Los casos 1 a 3 incluyen bacterias psicrófilas, acéticas, lácticas, mohos y levaduras, y no hay riesgo para la salud humana pero sí para la vida útil del alimento; los casos 4 a 6 incluyen indicadores de contaminación por bacterias mesófilas aerobias y anaerobias, coliformes fecales, mohos y levaduras, y otros; los casos 7 a 9 indican riesgo moderado porque no peligra la vida del consumidor pero pueden causar molestias en periodos cortos, aunque rara vez dejan secuelas, causados por *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, entre otros; los casos 10 a 12, señalan riesgo serio con microorganismos que causan enfermedades de duración moderada y no suelen dejar secuelas como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Cryptosporidium parvum*; y los casos 13 a 15 representan riesgo grave, los microorganismos causan enfermedades que ponen en peligro la vida del consumidor, son de larga duración y la mayoría de veces causan secuelas crónicas como *Clostridium botulinum*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella typhi*. Para los casos 1 al 9 se utilizan los planes de muestreo de tres clases, mientras que para los casos 10 al 12 los de dos clases (Legan *et al.*, 2001; ICMSE, 2002). Los planes de muestreo de tres clases pueden tener mayor efectividad porque permiten carga microbiana alta. Mientras que los planes de dos clases aseguran rechazo de lotes contaminados por patógenos de baja dosis infectiva (<10 unidades formadoras de colonias por gramo, UFC g⁻¹). Legan *et al.* (2001) sugieren usar estos planes con un nivel de protección >95 %.

Durante el muestreo de alimentos es frecuente la incertidumbre en la elección del tamaño de la muestra (n), necesaria para reducir el riesgo de aceptar

Schothorst *et al.* (2009) emphasize the correct use of the sampling plans for determining the MC in an effective and practical form. To this respect, the ICMSE (2002) suggests sampling plans designed according to the risk of the pathogen, the food type, management conditions and the population to which it is directed. These plans are classified in 15 cases as a function of the combinations of health risk and the conditions of use. Cases 1 to 3 include psychrophilic, acetic, and lactic bacteria, molds and yeasts and there is no risk to human health, but there is risk for the useful life of the food; cases 4 to 6 include contamination indicators, aerobic and anaerobic mesophilic bacteria, fecal coliform bacteria, molds and yeasts, and others; cases 7 and 9 indicate moderate risk because the life of the consumer is not endangered, but they can cause problems in short periods, although they rarely have lasting effects, caused by *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, among others; cases 10 to 12 indicate serious risk with microorganisms that cause diseases of moderate duration and do not tend to have lasting effects such as *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Cryptosporidium parvum*; and cases 13 to 15 represent grave risk, the microorganisms cause diseases that endanger the life of the consumer, are of long duration and most frequently cause chronic effects such as *Clostridium botulinum*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. For cases 1 to 9 the sampling plans of three classes are used, while for cases 10 to 12 those of two classes (Legan *et al.*, 2001; ICMSE, 2002). The sampling plans of three classes can have greater effectiveness because they permit a wide microbial load, whereas the plans of two classes insure the rejection of lots contaminated by ineffective low dose pathogens (<10 colony forming units per gram, UFC g⁻¹). Legan *et al.* (2001) suggest using these plans with a protection level of >95 %.

During food sampling, uncertainty is frequent in the selection of the size of sample (n) necessary for reducing the risk of erroneous acceptance (b) or rejection (a) of a lot. Therefore, it is necessary to select the size of the sample as a function of its nature, incidence level of the pathogen in the food and protection level (also known as reliability level or probability of rejection) for the consumer (Dahms, 2004; Johnston *et al.*, 2006). Whiting *et al.* (2006) indicate that the higher the protection level, the

(b) o de rechazar (a) erróneamente un lote. Por lo anterior, es necesario elegir el tamaño de la muestra en función de su naturaleza, nivel de incidencia del patógeno en el alimento y nivel de protección (conocido también como nivel de confiabilidad o probabilidad de rechazo) para el consumidor (Dahms, 2004; Johnston *et al.*, 2006). Whiting *et al.* (2006) indican que entre mayor sea el nivel de protección, el tamaño de n se incrementa, mientras que el valor tolerable (m) de microorganismos se reduce. Para la elección de un plan de muestreo, Zwietering (2009) sugiere que debe evaluarse el nivel de riesgo a través de modelos estadísticos. Sin embargo, para nopal verdura no hay estudios que identifiquen el nivel de calidad (NC) con el que las autoridades certifican unidades de producción, tampoco se ha establecido un tamaño de muestra para cada necesidad del mercado ni la comparación entre un sistema de producción tradicional y uno con reconocimiento en SRRC.

Por tanto, los objetivos del presente estudio fueron: conocer el nivel de calidad de un sistema de producción de nopal verdura con reconocimiento del SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) en la aplicación de SRRC y sin éste, estimar el nivel de protección para el consumidor con base a los tamaños de muestra estipulados en los planes de muestreo de la ICMSF (2002); determinar el nivel de calidad aceptable para diferentes niveles de protección en planes de muestreo de dos (patógenos de daño severo) y tres clases (indicadores de contaminación). Además, mediante simulación Montecarlo y distribución Pert se compara el nivel de protección para el consumidor al adquirir productos de unidades de producción con y sin reconocimiento en SRRC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Planes de muestreo

Planes de muestreo de dos clases

La ICMSF (2002), sugiere usar el plan de muestreo de dos clases cuando los microorganismos están uniformemente distribuidos en el lote o para definir riesgo directo a la salud con potencial de diseminación y riesgo grave. Este plan utiliza la siguiente notación:

N = tamaño del lote; n = tamaño de la muestra; p = fracción de unidades (cajas de nopal) que cumple con las especificaciones

size of n increases, while the tolerable value (m) of microorganisms is reduced. For the selection of a sampling plan, Zwietering (2009) suggests that the risk level should be evaluated by means of statistical models. However, for cactus leaf, there are no studies that identify the quality level (QL) with which the authorities certify production units. Furthermore, no sample size has been established for the different needs of the market or the comparison between a traditional production system and one with recognition in CRRS.

Therefore, the objectives of the present study were as follows: to know the quality level of a cactus leaf production system with recognition of the SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) in the application of the CRRS and without it, to estimate the consumer protection level based on the sample sizes stipulated in the sampling plans of the ICMSF (2002); to determine the quality level acceptable for different protection levels in sampling plans of two (pathogens of severe damage) and three classes (contamination indicators). Besides, through Montecarlo simulation and Pert distribution, the protection level was compared when acquiring products of production units with and without recognition in CRRS.

MATERIALS AND METHODS

Sampling plans

Sampling plans of two classes

The ICMSF (2002) suggests using the sampling plan of two classes when the microorganisms are uniformly distributed in the lot or to define direct risk to health with potential of dissemination and grave risk. This plan utilizes the following notation:

N = size of the lot; n = size of the sample; p = fraction of units (boxes of cactus leaf) that comply with the required microbiological specifications; m = number of colony forming units (CFU) permitted; d = number of defective units (boxes of cactus leaf) acceptable; if $d > c$, the lot is rejected, otherwise the lot is accepted; P_a = probability of acceptance; P_r = probability of rejection (protection level for the client or reliability level) and $P_r = 1 - P_a$.

Sampling plans of three classes

The plan of attributes of three classes is used for the sampling of lots, where the distribution of the pathogens is heterogeneous

microbiológicas requeridas; m = número de unidades formadoras de colonias (UFC) permitidas; d = número de unidades (cajas de nopal) defectuosas que exceden a m ; c = número de unidades defectuosas (cajas de nopal) aceptables; si $d > c$, el lote se rechaza, de lo contrario se acepta el lote; P_a = probabilidad de aceptación; P_r = probabilidad de rechazo (nivel de protección para el cliente o nivel de confiabilidad) y $P_r = 1 - P_a$.

Planes de muestreo de tres clases

El plan de atributos de tres clases se usa para el muestreo de lotes, donde la distribución de los patógenos es heterogénea y cuando se consideran análisis cuantitativos con dos límites microbiológicos: m (límite superior del nivel aceptable) y M (límite superior del nivel marginalmente aceptable) (ANMAT, 2005; Dahms, 2004). Estos planes no son tan estrictos y son apropiados donde el riesgo es relativamente bajo; la ICMSF (2002) propone utilizar este muestreo para los casos 1 al 9, en los cuales se manejan organismos de descomposición y contaminación de alimentos. Este plan utiliza la siguiente notación:

N = tamaño del lote; n = tamaño de la muestra; p_0 = fracción de unidades aceptables (cajas de nopal) para considerar que un lote cumple con las especificaciones microbiológicas; p_1 = fracción de unidades que se encuentra en el límite aceptable de las especificaciones microbiológicas requeridas; $p_2 = 1 - (p_0 + p_1)$ = fracciones de unidades que no cumple con las especificaciones microbiológicas; m = número máximo de unidades formadoras de colonias (UFC) que separa la calidad aceptable de la rechazable; M = número de unidades formadoras de colonias (UFC) que separa la calidad marginalmente aceptable de la rechazable; d_1 = el número de unidades en la muestra que se encuentran en el límite aceptable de las especificaciones microbiológicas o de aquellas que no cumplen, tal que $M > d_1 > m$, d_2 = el número de unidades alimenticias en la muestra que no cumplen las especificaciones microbiológicas requeridas es decir $d_2 > M$; c_1 = es el máximo número aceptable para la suma de unidades que se encuentran entre m y M y las unidades que exceden M ; c_2 = el máximo número aceptable para las unidades que exceden M ; P_a = probabilidad de aceptación; P_r = probabilidad de rechazo (nivel de protección para el cliente o nivel de confiabilidad) y $P_r = 1 - P_a$.

La distribución hipergeométrica trivariada asociada a este muestreo se describe así:

$$\left(\frac{n!}{d_0!d_1!d_2!} \right) \frac{D_0^{[d_0]} D_1^{[d_1]} D_2^{[d_2]}}{N^{[n]}} \quad (1)$$

and when quantitative analyses are considered with two microbiological limits: m (upper limit of the acceptable level) and M (upper limit of the marginally acceptable level) (ANMAT, 2005; Dahms, 2004). These plans are not as strict and are appropriate where the risk is relatively low; the ICMSF (2002) proposes using this sampling for cases 1 to 9, in which organisms of decomposition and contamination of food are managed. This plan uses the following notation:

N = lot size; n = sample size; p_0 fraction of acceptable units (cactus leaf boxes) for considering that a lot complies with the microbiological specifications; p_1 = fraction of units found in the acceptable limit of the required microbiological specifications; $p_2 = 1 - (p_0 + p_1)$ = fractions of units that do not comply with the microbiological specifications; m = maximum number of colony forming units (CFU) that separates the acceptable from the rejectable quality; M = number of colony forming units (CFU) that separates the marginally acceptable from the rejectable quality; d_1 = the number of units in the sample that are found in the acceptable limit of the microbiological specifications or of those that do not comply, so that $M > d_1 > m$, d_2 = the number of alimentary units in the sample that do not comply with the required microbiological specifications, that is, $d_2 > M$; c_1 = is the maximum number acceptable for the sum of units that are found between m and M and the units that exceed M ; c_2 = the maximum number acceptable for the units that exceed M ; P_a = probability of acceptance; P_r = probability of rejection (protection level for the client or reliability level) and $P_r = 1 - P_a$.

The trivariate hypergeometric distribution associated with this sampling is described as follows:

$$\left(\frac{n!}{d_0!d_1!d_2!} \right) \frac{D_0^{[d_0]} D_1^{[d_1]} D_2^{[d_2]}}{N^{[n]}} \quad (1)$$

where $D^{[d]} = D(D-1)(D-2)\dots(D-d+1)$. If N , D_0 , D_1 and D_2 tend toward infinity then (1) approaches the trivariate binomial distribution:

$$\left(\frac{n!}{d_0!d_1!d_2!} \right) p_0^{d_0} p_1^{d_1} p_2^{d_2} \quad (2)$$

where $p_i = D_i/N$ for $i = 0, 1$ and 2 .

For this study the trivariate binomial distribution was used considering that the lots of boxes of cactus leaf were more than

donde $D^{(d)} = D(D-1)(D-2)\dots(D-d+1)$. Si N , D_0 , D_1 y D_2 tienden a infinito entonces (1) se aproxima a la distribución binomial trivariada:

$$\left(\frac{n!}{d_0!d_1!d_2!}\right) p_0^{d_0} p_1^{d_1} p_2^{d_2} \tag{2}$$

donde $p_i = D_i/N$ para $i = 0, 1$ y 2 .

Para este estudio se uso la distribución binomial trivariada por considerar que los lotes de cajas de nopal verdura eran mayor a 150 cajas ($N \rightarrow \infty$). Por tanto, la probabilidad de aceptación para esta distribución es:

$$P_a = \sum_{i=0}^{c_1-j} \sum_{j=0}^{c_2} \frac{n!}{i!j!(n-i-j)!} p_0^{n-i-j} p_1^i p_2^j \tag{3}$$

En el caso de que $c_2=0$, la ecuación (3) queda reducida a:

$$P_a = \sum_{i=0}^c \binom{n}{i} p_0^{n-i} p_1^i \tag{4}$$

Esta distribución se asemeja a una distribución binomial, sin embargo, no lo es porque p_0+p_1 no suma la unidad. Sólo para el caso en que la población no contiene unidades alimenticias que no cumplen con las especificaciones microbiológicas (ej. $p_2=0$), se convierte en una binomial ordinaria (Zelterman, 2006) que se utilizó en este estudio para determinar la presencia o ausencia de patógenos.

Para maximizar la protección contra el riesgo de aceptar lotes que no cumplen con las especificaciones microbiológicas debería utilizarse $c_1=0$ y $c_2=0$. Entre mayor es el tamaño de muestra, la probabilidad de rechazo es mayor ($P_r=1-P_a$), lo cual implica tener un mayor nivel de protección para los consumidores en contra de lotes que no cumplen las especificaciones microbiológicas. Si se consideran los valores de $c_1=c_2=0$, el tamaño de muestra se define así:

$$P_a \leq \frac{n!}{0!(n-0)!} p_0^{n-0} p_1^0 \tag{5}$$

donde $P_a \leq P_0^n$ de tal forma que:

$$n = \frac{\log(P_a)}{\log(P_0)} \tag{6}$$

150 boxes ($N \rightarrow \infty$). Therefore, the probability of acceptance for this distribution is:

$$P_a = \sum_{i=0}^{c_1-j} \sum_{j=0}^{c_2} \frac{n!}{i!j!(n-i-j)!} p_0^{n-i-j} p_1^i p_2^j \tag{3}$$

In the case that $c_2 = 0$, equation (3) is reduced to:

$$P_a = \sum_{i=0}^c \binom{n}{i} p_0^{n-i} p_1^i \tag{4}$$

This distribution resembles a binomial distribution, however, it is not because p_0+p_1 does not sum up to the unit. Only for the case in which the population does not contain food units that do not comply with the microbiological specifications (ex. $p_2 = 0$), it converts to an ordinary (Zelterman, 2006) presence or absence of pathogens.

To maximize the protection against the risk of accepting lots that do not comply with the microbiological specifications $c_1=0$ and $c_2=0$ should be used. The larger the size of the sample, the higher the likelihood of rejection ($P_r=1-P_a$), which implies having a higher level of protection for consumers against lots that do not comply with the microbiological specifications. If the values of $c_1=c_2 = 0$, the size of the sample is defined as:

$$P_a \leq \frac{n!}{0!(n-0)!} p_0^{n-0} p_1^0 \tag{5}$$

where $P_a \leq P_0^n$ so that:

$$n = \frac{\log(P_a)}{\log(P_0)} \tag{6}$$

Pert distribution

The Pert distribution is a version of the beta distribution and as with the triangular distribution, requires three parameters: minimum (A), most likely (B) and maximum desired (C) (Mun, 2011). It is used to model estimations, commonly in the identification of risks and cost estimation in projects (Premachandra, 2001). This distribution generally presents an asymmetry to the right due to the fact that it estimates values close to the most likely value (Mun, 2011).

The function of the Pert distribution is expressed as follows:

$$f(x) = \frac{(x - \min)^{A1-1} (\max - x)^{A2-1}}{B(A1, A2)(\max - \min)^{A1+A2-1}} \tag{7}$$

Distribución Pert

La distribución PERT es una versión de la distribución beta e igual que la distribución triangular requiere tres parámetros: mínimo (A), más probable (B) y máximo deseable (C) (Mun, 2011). Se usa para modelar estimaciones, comúnmente en la identificación de riesgos y estimación de costos en proyectos (Premachandra, 2001). Esta distribución por lo general presenta una asimetría a la derecha debido a que estima valores cercanos al más probable (Mun, 2011).

La función de la distribución Pert se expresa como:

$$f(x) = \frac{(x - \min)^{A1-1} (\max - x)^{A2-1}}{B(A1, A2)(\max - \min)^{A1+A2-1}} \quad (7)$$

donde B= función Beta y;

$$A1 = 6 \left[\frac{\min + 4(\text{mod } a) + \max - \min}{\max - \min} \right] \quad (8)$$

$$A2 = 6 \left[\frac{\min + 4(\text{mod } a) + \max}{\max - \min} \right] \quad (9)$$

Las expresiones típicas de la distribución Pert para la media y desviación estándar se expresan:

$$\text{Media} = \frac{\min + 4(\text{mod } a) + \max}{6} \quad (10)$$

$$\text{Desviación estándar} = \sqrt{\frac{(\mu - \min)(\max - \mu)}{7}} \quad (11)$$

La media para la distribución Pert es cuatro veces más sensible al valor más probable que a los valores extremos y la desviación estándar es menos sensible a los valores extremos que la distribución triangular, particularmente cuando las distribuciones son sesgadas (Mun, 2011). Esta distribución se usó para simular la toma de 100 000 muestras de forma aleatoria y comparar el nivel de rechazo de los esquemas de muestreo para un sistema de producción certificado y uno tradicional.

where B = Beta function and;

$$A1 = 6 \left[\frac{\min + 4(\text{mod } a) + \max - \min}{\max - \min} \right] \quad (8)$$

$$A2 = 6 \left[\frac{\min + 4(\text{mod } a) + \max}{\max - \min} \right] \quad (9)$$

The typical expressions of the Pert distribution for the mean and standard deviation are expressed:

$$\text{Mean} = \frac{\min + 4(\text{mod } a) + \max}{6} \quad (10)$$

$$\text{Standard deviation} = \sqrt{\frac{(\mu - \min)(\max - \mu)}{7}} \quad (11)$$

The mean for the Pert distribution is four times more sensitive to the most likely value than to the extreme values and the standard deviation is less sensitive to the extreme values than the triangular distribution, particularly when the distributions are biased (Mun, 2011). This distribution was used to simulate the taking of 100 000 samples in a random fashion and to compare the rejection level of the sampling plans for a certified production system and a traditional one.

Observational study

An observational study was considered with a population of 14 producers in the municipality of Otumba, State of Mexico, whose production units were recognized in the application of CRRS and another population of the same size of producers with a traditional production system. From March of 2008 to February of 2009, a sample was taken bimonthly composed of 10 kg of preliminary boxes of cactus leaf from the different production units. During this period six samples were taken with a total of 120 kg of sample. The microbiological analyses were: recount of mesophilic bacteria in plates of Petrifilm™ (3M, Saint Paul, MN, USA); count of total coliform bacteria, fecal coliform bacteria and detection of *Salmonella* according to the methodologies described by the norms NOM-112-SSA1-1994 and NOM-114-SSA1-1994, respectively (SSA, 1995b; SSA, 1995c).

Estudio observacional

Se consideró un estudio observacional con una población de 14 productores en el municipio de Otumba, Estado de México, cuyas unidades de producción fueron reconocidas en la aplicación de SRRC y otra población del mismo tamaño de productores con sistema de producción tradicional. De marzo de 2008 a febrero de 2009, bimestralmente se tomó una muestra compuesta de 10 kg de cajas de nopal preliminares provenientes de las diferentes unidades de producción; durante este periodo se tomaron seis muestras con un total de 120 kg de muestra. Los análisis microbiológicos fueron: recuento de bacterias mesófilas en placas Petrifilm™ (3M, Saint Paul, MN, USA); cuenta de coliformes totales, coliformes fecales y detección de *Salmonella* de acuerdo con las metodologías descritas en las normas NOM-112-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994 respectivamente (SSA, 1995 b; SSA, 1995c).

Estimación del nivel de protección según el tamaño de muestra en un sistema de producción de nopal con SRRC

Los resultados microbiológicos del estudio observacional con nopal de unidades reconocidas en SRRC y de ST indicaron que *Salmonella* no estuvo presente, por lo que para estimar el nivel de calidad de producción de nopal verdura solamente se consideró el recuento de microorganismos con bajo riesgo para la salud (bacterias mesófilas y coliformes). Este nivel de calidad se empleó para estimar niveles de protección con diferentes tamaños de muestra tradicionalmente utilizados en el análisis microbiológico.

Determinación del NCA para diferentes niveles de protección en un sistema de producción de nopal con SRRC

Se determinó el NCA del lote p_0 , p_1 y p_2 para los niveles $Pr=80, 90$ y 99% usando como referencia los planes de muestreo de dos clases para los casos 10 al 15, que se refieren a patógenos que representan peligro de muerte o secuelas importantes crónicas o de larga duración, donde se consideró $p_2=c=0$; y los de tres clases para los casos 3 al 9, que se refieren a organismos de descomposición y contaminación de alimentos e indicadores microbiológicos.

Simulación Montecarlo para comparar un SRRC y un ST en la producción de nopal verdura

Para determinar el comportamiento de la distribución de rechazo de un SRRC y un ST, se realizaron simulaciones Montecarlo (100 000 iteraciones) con el software RiskAMP® (2010). Se usó la distribución Pert porque permite considerar tres valores

Estimation of the protection level according to the sample size in a production system of cactus leaf with CRRS

The microbiological results of the observational study with cactus leaf of units recognized in CRRS and of TS indicated that *Salmonella* was not present, therefore to estimate the quality level of cactus leaf production only the recount of microorganisms with low health risk (mesophilic and coliform bacteria) was considered. This quality level was used to estimate protection levels with different sample sizes traditionally used in microbiological analysis.

Determination of AQL for different protection levels in a production system of cactus leaf with CRRS

The AQL was determined of the lot p_0 , p_1 and p_2 for the levels $Pr=80, 90$ and 99% using as reference the sampling plans of two classes for cases 10 to 15, which refer to pathogens that represent danger of death or important chronic effects or of long duration, where $p_2=c=0$ was considered, and those of three classes for cases 3 to 9, which refer to organisms of decomposition and contamination of foods and microbiological indicators.

Montecarlo simulation for comparing a CRRS and a TS in the production of cactus leaf

To determine the behavior of the distribution of rejection of a CRRS and a TS, Montecarlo simulations were carried out (100 000 iterations) using the software RiskAMP® (2010). The Pert distribution was used because it makes it possible to consider three possible values for the percentage of acceptable units (p_0): a minimum number (A), a most likely number (B) and a maximum desirable number (C) in the dominion of the Pert distribution.

RESULTS AND DISCUSSION

Due to the presence of mesophilic and coliform bacteria, the quality level of cactus leaf production during this period for the CRRS was $p_0=0.85$, $p_1 = 0.15$ and $p_2 = 0$, whereas for the TS it was $p_0 = 0.40$, $p_1 = 0.60$ and $p_2 = 0$. In 85% and 40% of the cactus leaf samplings of CRRS and TS, mesophilic bacteria counts were found lower than $m = 100$ UFC g^{-1} and fecal coliform bacteria and total bacteria lower than $m = 100$ MPN (Most Probable Number) g^{-1} , the other samplings (15% and 60%) exceeded these limits without reaching the tolerable maximum of $M=100\ 000$ UFC g^{-1} for mesophilic bacteria and $M = 10\ 000$ MPN g^{-1} for fecal coliform and total

posibles para el porcentaje de unidades aceptables (p_0): un número mínimo (A), uno más probable (B) y uno máximo deseable (C) en el dominio de la distribución Pert.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la presencia de bacterias mesófilas y coliformes, el nivel de calidad de la producción de nopal verdura durante el periodo para el SRRC fue $p_0=0.85$, $p_1=0.15$ y $p_2=0$, mientras que para el ST fue de $p_0=0.40$, $p_1=0.60$ y $p_2=0$. En el 85 % y 40 % de los muestreos de nopal de SRRC y ST, se encontraron cuentas de bacterias mesófilas menores a $m=100$ UFC g^{-1} y coliformes fecales y totales menores a $m=100$ NMP (Número Más Probable) g^{-1} , los otros muestreos (15 % y 60 %) excedieron estos límites sin alcanzar el máximo tolerable de $M=100,000$ UFC g^{-1} para bacterias mesófilas y $M=10,000$ NMP g^{-1} para coliformes fecales y totales (ICMSF, 2002). No se detectó presencia de *Salmonella* sp. en las muestras analizadas.

Estimación del nivel de protección para el consumidor según el tamaño de muestra

Tomando como referencia el nivel de calidad de producción de nopal verdura, se estimó un tamaño de muestra para un nivel de confiabilidad de al menos 80 %, por considerarse un muestreo de microorganismos con riesgo bajo para la salud (bacterias mesófilas y coliformes). El Cuadro 1 muestra que para un SRRC ($p_0=0.85$, $p_1=0.15$ y $p_2=0$) un tamaño de muestra de 10 unidades proporciona un nivel de protección de 80.3 %, mientras que con 15 aumenta a 91.2 %. Por tanto, si se desea tener un nivel de protección mínimo de 80 % se necesita un tamaño de muestra mínimo de 10 kg de nopal para el análisis de laboratorio. Se observa que bajo un ST, donde el nivel de calidad es $p_0=0.40$, $p_1=0.60$ y $p_2=0$, el nivel de protección mínimo 80 % se alcanza con un mínimo de 3 kg. Esto ilustra que el tamaño de muestra debe definirse con base al nivel de calidad exigido o aceptable por el consumidor.

Determinación del NCA para diferentes niveles de protección en un sistema de producción de nopal con SRRC

En el Cuadro 2 se muestra que entre menor es la calidad del lote (elevado número de unidades que

Cuadro 1. Tamaños de muestra para determinar un nivel de protección al consumidor.

Table 1. Sample sizes to determine a consumer protection level.

n	P_r^\dagger en un SRRC	P_r^\ddagger en un ST
3	38.5	93.6
5	55.6	98.9
10	80.3	99.9
15	91.2	99.9
20	96.1	99.9

$^\dagger p_0=0.85$, $p_1=0.15$, $p_2=0$ y $c=0$.

$^\ddagger p_0=0.40$, $p_1=0.60$, $p_2=0$ y $c=0$.

bacteria (ICMSF, 2002). No presence of *Salmonella* sp. was detected in the samples analyzed.

Estimation of the consumer protection level according to the sample size

Taking as reference the quality level of cactus leaf production, a sample size was estimated for a reliability level of at least 80 %, for being considered a sampling of microorganisms with low health risk (mesophilic and coliform bacteria). Table 1 shows that for a CRRS ($p_0 = 0.85$, $p_1 = 0.15$ and $p_2 = 0$) a sample size of 10 units provides a protection level of 80.3 %, whereas with 15 it increases to 91.2 %. Therefore, if a minimum protection level of 80 % is desired, a minimum sample size of 10 kg of cactus leaf is required for the laboratory analysis. It is observed that under a TS, where the quality level is $p_0 = 0.40$, $p_1 = 0.60$ and $p_2 = 0$, the minimum protection level 80 % is reached with a minimum of 3 kg. This illustrates that the sample size should be defined based on the quality level required or acceptable for the consumer.

Determination of the AQL for different protection levels in a cactus leaf production system with CRRS

Table 2 shows that the lower the quality of the lot (high number of units that do not comply with the acceptable microbiological specifications), the higher the probability of rejection. For example, for case 10 ($n=5$, $c=0$) lots that only have 40 % of acceptable units are rejected with a probability of as much as 99 %, 60 % that are found between the acceptable and the tolerable microbiological limit, and 0 % of

Cuadro 2. Determinación de los valores de NCA para los niveles de protección 80, 90 y 99 % usando los planes de muestreo sugeridos por la ICMSF para los casos 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

Table 2. Determination of the values of AQL for protection levels 80, 90 and 99 % using the sampling plans suggested by the ICMSF for cases 10, 11, 12, 13, 14 and 15.

ICMSF	Nivel de protección (Pr)						
	80 %		90 %		99 %		
Caso	n	P ₀	P ₁	P ₀	P ₁	P ₀	P ₁
10*	5	0.72	0.28	0.63	0.37	0.40	0.60
11*	10	0.85	0.15	0.79	0.21	0.63	0.37
12*	20	0.92	0.8	0.89	0.11	0.79	0.21
13*	15	0.89	0.11	0.85	0.15	0.73	0.27
14*	30	0.95	0.5	0.92	0.8	0.85	0.15
15*	60	0.97	0.3	0.96	0.4	0.92	0.8

*c=p₂=0.

no cumplen con las especificaciones microbiológicas aceptables), mayor es la probabilidad de rechazo. Por ejemplo, para el caso 10 (n=5, c=0) se rechaza hasta con una probabilidad del 99 % a lotes que solo tienen 40 % de unidades aceptables, 60 % que se encuentran entre el límite microbiológico aceptable y el tolerable, y 0 % de las que no cumplen con dichas especificaciones microbiológicas. Mientras que para el caso 15 (n=60, c=0), el plan se vuelve más riguroso porque se requiere 92% de unidades que cumplan con el límite microbiológico aceptable.

Para los riesgos del 3 al 9, que se refieren a organismos de descomposición y contaminación de alimentos e indicadores microbiológicos, se utilizó el plan de muestreo de tres clases. En el Cuadro 3 se presentan los valores de NCA requeridos para obtener 80, 90 y 99 % de protección; así, para el caso 9, donde el valor de n=10 y c=1, el plan requiere que el producto presente 72 % de productos microbiológicamente aceptables. Un valor de c diferente de cero permite un p₀ menores que cuando c=0 (Cuadro 3).

Simulación Montecarlo para comparar dos esquemas de producción de nopal verdura

Para las unidades de producción certificadas con SRRC, el valor de A fue de 85 %, mientras que para B y C fueron 95 % y 99.99 %. Lo anterior es para construir un escenario deseado en un SRRC. Mientras

Cuadro 3. Determinación de los valores de NCA para los niveles de protección 80, 90 y 99 % utilizando los planes de muestreo sugeridos por la ICMSF para los casos 3, 6, 8 y 9.

Table 3. Determination of the values of AQL for protection levels 80, 90 and 99 % using the sampling plans suggested by the ICMSF for cases 3, 6, 8 and 9.

ICMSF	Nivel de protección (Pr)						
	80 %		90 %		99 %		
Caso	n	P ₀	P ₁	P ₀	P ₁	P ₀	P ₁
3	5	51	49	41	59	22	78
6	5	51	49	41	59	22	78
8	5	51	49	41	59	22	78
9	10	72	28	66	34	49	52

*c=1, p₂=0.

those that do not comply with these microbiological specifications.

For risks 3 to 9, which refer to organisms of decomposition and contamination of foods and microbiological indicators, the sampling plan of three classes was used. Table 3 shows the values of AQL required to obtain 80, 90 and 99 % protection; thus, for case 9, where the value of n = 10 and c = 1, the plan requires that the product present 72 % of microbiologically acceptable products. A value of c different from zero permits a p₀ that is smaller than when c = 0 (Table 3).

Montecarlo simulation for comparing two plans of cactus leaf production

For the production units certified with CRRS, the value of A was 85 %, while for B and C they were 95 % and 99.99 %. The above is for constructing a scenario desired in a CRRS, whereas for the TS the values A 0 10 %, B = 15 % and C = 40 % were considered, for the purpose of comparison.

The Montecarlo simulation indicated that the AQL for units certified in CRRS (p₀ = 94.19, p₁ = 5.81 and p₂ = 0 %) is higher than for those of a TS (p₀ = 18.33, p₁ = 81.67 and p₂ = 0 %). Figure 1 shows that the number of rejections is higher in a CRRS due to its requirement level, and this is especially evident at a protection level of 40 %. It is deduced that the higher the quality level required (p₀, p₁ and p₂), there is a probability of having greater rejection of the product.

que para el ST se consideraron los valores $A=10\%$, $B=15\%$ y $C=40\%$, con fines de comparación.

La simulación Montecarlo indicó que el NCA para unidades certificadas en SRRC ($p_0=94.19$, $p_1=5.81$ y $p_2=0\%$) es mayor que para las de un ST ($p_0=18.33$, $p_1=81.67$ y $p_2=0\%$). En la Figura 1 se muestra que el número de rechazos es mayor en un SRRC debido a su nivel de exigencia y esto es especialmente notorio a partir de un nivel de protección de 40% . Se deduce que entre mayor sea el nivel de calidad requerida (p_0 , p_1 y p_2), existe la probabilidad de tener mayor rechazo de producto.

La combinación de planes de muestreo de dos y tres clases con simulación Montecarlo, usando la distribución Pert proporciona una metodología que permite comparar dos o más sistemas de producción de productos hortofrutícolas, si se define previamente un nivel de protección deseado y los posibles valores mínimo, probable y máximo deseables del porcentaje de unidades que cumplen con las especificaciones microbiológicas requeridas para asegurar la salud del consumidor.

CONCLUSIONES

De acuerdo con el plan de muestreo propuesto y el nivel de calidad de los productores de nopal verdura de la región oriente del Estado de México, se requiere un tamaño de muestra mínimo de 10 kg , para lograr un nivel de protección del $P_r=80\%$, mientras que para el tradicional se requieren 3 kg . Además bajo los sistemas de reducción de riesgos de contaminación el nivel de protección es mayor, así como el nivel de calidad requerido por el consumidor.

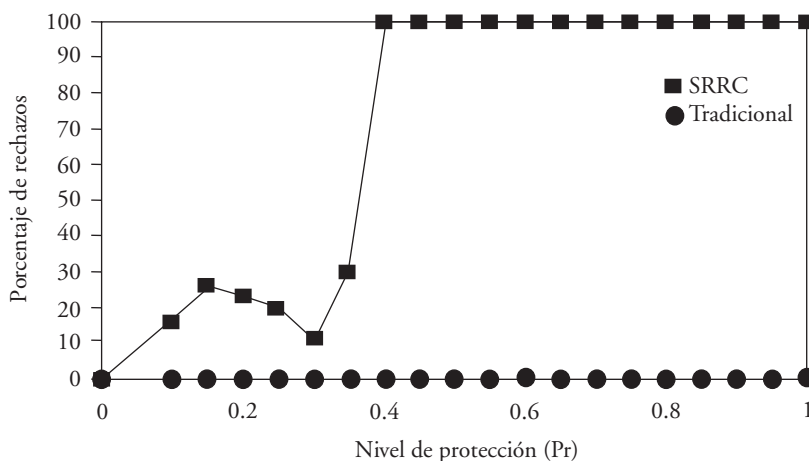


Figura 1. Función de probabilidad de rechazo con dos sistemas de producción de nopal verdura, SRRC: ($p_0=94.19$, $p_1=5.80$ y $p_2=0\%$) y ST ($p_0=18.33$, $p_1=81.66$ y $p_2=0\%$).

Figure 1. Function of probability of rejection with two production systems of cactus leaf, CRRS: ($p_0=94.19$, $p_1=5.80$ and $p_2=0\%$) and TS ($p_0=18.33$, $p_1=81.66$ and $p_2=0\%$).

The combination of sampling plans of two and three classes with Montecarlo simulation using the Pert distribution provides a methodology that makes it possible to compare two or more production systems of horticultural products, if a desired protection level is previously defined along with possible minimum, probable and desired maximum values of the percentage of units that comply with the microbiological specifications required to insure the health of the consumer.

CONCLUSIONS

According to the proposed sampling plan and the quality level of the cactus leaf producers of the eastern region of the State of Mexico, a minimum sample size of 10 kg is required to achieve a protection level of $P_r=80\%$, whereas for the traditional system 3 kg are required. In addition, under the systems of contamination risk reduction the protection level is higher, as well as the quality level required by the consumer.

—End of the English version—

-----*

LITERATURA CITADA

ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). 2005. Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Argentina. 21 p.

- Callejas, N., J. Matus, J. García, M. Martínez, y J. Salas. 2006. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y derivados en el Estado de México. *Agrociencia* 43: 73-82.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2008. Investigación de los brotes infecciosos causados por *Salmonella* saintpaul: Actualización del 30 de julio, 2008 - Información sobre el número de casos actualizada hasta las 9 pm EST del 29 de julio, 2008. http://s3.esoft.com.mx/esofthands/include/upload_files/4/Archivos/2008-06-09%20FDA%20Investigacion%20de%20Brotes%20Infecciosos.pdf. (Consultado: noviembre, 2007)
- Dahms, S. 2004. Microbiological sampling plans-Statistical aspects. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 95: 32-44.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2007. Ley Federal de Sanidad Vegetal. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/Combo/L-121.pdf>. (Consultado: noviembre, 2011).
- Fernández-Escartin, E. 2008. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos, México, 2da. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. 967 p.
- García-Gómez, R., J. Chavez-Espinosa, A. Mejía-Chávez, and C. Durán-Bazúa. 2002. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Rev. Latin, Microbiol.* 44 (1): 24-30.
- Gorris, L. 2006. Food safety objective: An integral part of food chain management. *Food Control* 16:801-809.
- ICMSF. 2002. Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA. 362 p.
- Johnston, L., L. Jaykus, D. Moll, J. Anciso, B. Mora, and C. Moe. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Int. J. Food Microbiol.* 112:83-95.
- Legan, J., M. Vandeven, S. Dahms, and M. Cole. 2001. Determining the concentration of microorganisms controlled by attributes sampling plans. *Food Control* 13:137-147.
- Mun, J. 2011. Simulador de Riesgo. Manual de Usuario en Español. Real Options Valuation, Inc. 208 p.
- Nguyen-the, C., and F. Carlin. 2004. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 34:371-401.
- Premachandra, I. 2001. An approximation of the activity duration distribution in PERT. *Comp. Oper. Res.* 28(5): 443-452
- RiskAMP. 2010. Monte Carlo Add-In for Excel Professional. Structured Data. New York City; NY, USA.
- Schothorst, M. van, M. Zwietering, T. Ross, R. Buchanan, and M. Cole. 2009. Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives. *Food Control* 20:967-979.
- SSA. 1995a. NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Prácticas de Higiene y Sanidad en la Preparación de Alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. 5 p.
- SSA. 1995b. NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número Más Probable. 16 p.
- SSA. 1995c. NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Determinación de *Salmonella* en Alimentos. 37 p.
- SSA. 2010. NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Secretaría de Salud. 29 p.
- Whiting, R., A. Rainosek, R. Buchanan, M. Miliotis, D. LaBarre, W. Long, A. Ruple and S. Schaub. 2006. Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 263-267.
- Zelterman, D. 2006. Models for discrete data. Oxford University Press. USA. New York City; NY., USA. 296 p.
- Zwietering, M. 2009. Quantitative risk assessment: Is more complex always better?. Simple is not stupid and complex is not always more correct. *Int. J. Food Microb.* 134:57-62.