

Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo



Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo



Edita:

Dirección General de Ordenación e Inspección.
Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid

El presente documento se ha redactado únicamente con fines informativos. La Dirección General de Ordenación e Inspección no garantiza la exactitud de los datos e informaciones ofrecidos, ni asume la responsabilidad en relación con cualquier uso que de ellos pudiere hacerse. Por consiguiente, es aconsejable que los usuarios consulten la legislación en la que está basada antes de usar, bajo su exclusiva responsabilidad, esta guía

Redactado por:

- Silvia Iñigo Nuñez. Referente del Programa de Vigilancia y Control de Contaminantes y Residuos en Alimentos, año 2010 (*Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria*)
- Alicia Jiménez Manso. Responsable del Subprograma de Control de Contaminantes Biológicos, año 2010 (*Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria*)

Comisión del Subprograma de Control de Contaminantes Biológicos, año 2010:

- *M^a Silvia García (Servicio de Salud Pública del Área I)*
- *Concepción Fernández (Servicio de Salud Pública del Área II)*
- *Pedro Carbonero (Servicio de Salud Pública del Área III)*
- *Berta Fernández (Servicio de Salud Pública del Área V)*
- *Paloma Estrada (Servicio de Salud Pública del Área V I)*
- *Concepción Otero (Servicio de Salud Pública del Área VIII)*
- *Ángeles Ferrer (Servicio de Salud Pública del Área IX)*
- *Montserrat Daza (Servicio de Salud Pública del Área IX)*
- *M^a Marta Fernández (Servicio de Salud Pública del Área X)*
- *M^a Ángeles Peñaranda (Servicio de Salud Pública del Área XI)*
- *Nuria Gómez (Servicio de Salud Pública del Área XI)*
- *Montserrat Alonso (Servicio de Gestión de la Seguridad Alimentaria)*
- *Javier Castro (Laboratorio Regional de Salud Pública)*
- *Mercedes Sotodosos (Sección de Evaluación y Vigilancia de Riesgos Alimentarios)*

Revisado por:

Micaela García Tejedor. Subdirectora General de Higiene y Seguridad Alimentaria

Fecha de finalización de la redacción: 4 de abril de 2011

Edición: Segunda, agosto 2012

(Corrección de terminología de Edición: Primera, octubre 2011)

Presentación

Es un placer para mí presentar la "Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo".

Para el Gobierno de la Comunidad de Madrid garantizar la salud de los madrileños resulta prioritario. Por ello, al igual que ocurre en otros ámbitos, en materia de seguridad alimentaria la prevención también resulta indispensable. En este contexto es donde el control de la bacteria *Listeria monocytogenes* que puede encontrarse en determinados alimentos, se convierte en un factor clave. En este sentido, la propia Unión Europea ha puesto en marcha diversas iniciativas con objeto de que las empresas alimentarias puedan demostrar que los alimentos que elaboran son seguros.

Con el presente documento tratamos de difundir entre las empresas alimentarias de la región y los laboratorios que realizan las pruebas analíticas que correspondan, las recomendaciones técnicas europeas en esta materia.

Tengo el pleno convencimiento de que esta guía, fruto del esfuerzo de un equipo humano de profesionales de gran valía, va a constituir una herramienta práctica muy eficaz e interesante que facilitará sin lugar a dudas la consecución de un claro objetivo: garantizar la salud de los madrileños.

Paloma Martín Martín
Directora General de Ordenación e Inspección

A quién se dirige esta Guía

La guía está dirigida primordialmente a las **empresas alimentarias que fabrican alimentos listos para el consumo**, con el objetivo de facilitarles las **recomendaciones europeas para realizar los estudios de vida útil preceptivos en relación con Listeria monocytogenes**.

En los anexos también se han incluido protocolos de trabajo destinados a los **laboratorios de ensayo** que colaboran con las empresas en la realización de estos estudios.

En qué bibliografía se basa

Esta Guía se ha redactado recopilando las recomendaciones técnicas para realizar estudios de vida útil que se detallan en los siguientes documentos comunitarios:

- *Documento Guía de la Comisión Europea* ([CE, 2008 a](#)), dirigido a las **empresas alimentarias**.
- *Documento Guía técnica del Laboratorio Comunitario de Referencia para Listeria monocytogenes* ([CE, 2008 b](#)), dirigido a los **laboratorios**.

En las descripciones de los estudios complementarios, dirigidas a las empresas, se han añadido opiniones de la Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos ([AFSSA, 2005](#)). En la BIBLIOGRAFÍA se reseñan las citas completas de estos documentos y se facilitan las direcciones de Internet donde están disponibles para su acceso directo y gratuito. La terminología de esta Guía se ha adaptado a la utilizada por el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición ([AESAN, 2011](#)).

Qué contiene y cómo se utiliza

La Guía comienza con unas CONSIDERACIONES PREVIAS para recordar el marco legal de los estudios de vida útil y su inclusión dentro de los sistemas de autocontrol, resaltar la necesidad frecuente de combinar varios, clarificar la colaboración entre empresas e insistir en la importancia de la documentación como evidencia objetiva.

A continuación se describen los estudios obligatorios sobre las CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y LA BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA para empezar a establecer la vida útil, y que, en algunos casos, pueden ser suficientes.

Se termina relacionando los ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS posibles, destacando sus aplicaciones prácticas, ventajas y limitaciones.

Los ANEXOS se han reservado para la información más aplicativa y práctica. Los **Anexos 1 y 2**, con árboles de decisiones y ejemplos de su uso, orientan a las empresas alimentarias para comenzar a abordar los estudios de vida útil a realizar. En el **Anexo 3** se ilustra el uso de los modelos matemáticos de microbiología predictiva. Los **Anexos 4, 5 y 6** contienen los protocolos de trabajo recomendados para los laboratorios de ensayo que practican las pruebas analíticas.

El [Anexo 7](#) contiene un listado de verificación que hemos elaborado para tratar de resumir todas las directrices técnicas comunitarias descritas a lo largo de la Guía. En el [Anexo 8](#) hemos recopilado algunos valores publicados de pH y actividad de agua de distintos alimentos listos para consumo, a modo de ejemplo y orientación. Y en el [Anexo 9](#) hemos incluido los criterios microbiológicos vigentes para L. monocytogenes, las definiciones más relevantes y los acrónimos utilizados en la redacción de la Guía.

Índice

| | |
|---|-----------|
| CONSIDERACIONES PREVIAS | 6 |
| 1. <i>Evaluación de la vida útil combinando diferentes herramientas</i> | 9 |
| 2. <i>Colaboración entre empresas alimentarias.....</i> | 10 |
| 3. <i>Documentación de los estudios de vida útil.....</i> | 11 |
| CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA..... | 12 |
| 1. <i>Características físico-químicas.....</i> | 13 |
| 2. <i>Bibliografía científica</i> | 14 |
| ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS | 15 |
| 1. <i>Histórico de datos</i> | 16 |
| 2. <i>Microbiología predictiva (Modelos matemáticos).....</i> | 17 |
| 3. <i>Pruebas de laboratorio específicas.....</i> | 19 |
| 3.1. <i>Estudios de durabilidad.....</i> | 20 |
| 3.2. <i>Ensayos de desafío</i> | 21 |
| 3.2.1. <i>Ensayos de desafío para el potencial de crecimiento.....</i> | 22 |
| 3.2.2. <i>Ensayos de desafío para la velocidad máxima de crecimiento....</i> | 24 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 25 |
| ANEXOS | 26 |
| ANEXO 1. ÁRBOL DE DECISIONES PARA REALIZAR ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL | 27 |
| ANEXO 2. ÁRBOL DE DECISIONES PARA VALORAR LA VIDA ÚTIL..... | 31 |
| ANEXO 3. EJEMPLO DEL USO DE MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA | 37 |
| ANEXO 4. PROTOCOLO DE ESTUDIOS DE DURABILIDAD..... | 38 |
| ANEXO 5. PROTOCOLO DE LOS ENSAYOS DE DESAFÍO PARA EL POTENCIAL DE CRECIMIENTO..... | 42 |
| ANEXO 6. PROTOCOLO DE ENSAYOS DE DESAFÍO PARA LA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO | 50 |
| ANEXO 7. LISTADO DE VERIFICACIÓN DE DIRECTRICES TÉCNICAS..... | 57 |
| ANEXO 8. EJEMPLOS DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS | 63 |
| ANEXO 9. CRITERIOS, DEFINICIONES Y ACRÓNIMOS | 65 |

Consideraciones previas

La obligación legal de que los fabricantes de alimentos listos para el consumo realicen estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* está establecida en el Artículo 3, apartado 2 del [Reglamento CE Nº 2073/2005](#) (DOCE, 2005): “*Cuando sea necesario, los explotadores de las **empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios** conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto es aplicable especialmente a los **alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de Listeria monocytogenes** y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria*”.

En la tabla 1 se recogen los estudios mencionados en el citado Reglamento, aunque hay que tener en cuenta que, en general, la duración de la vida útil de los alimentos se suele establecer combinando las informaciones procedentes de las distintas fuentes.

Tabla 1. Estudios para investigar el cumplimiento de los criterios (Anexo II del Reglamento CE nº 2073/2005)

| <i>Características del producto y bibliografía científica.</i> |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Especificaciones de las características fisicoquímicas del producto, como pH, aw, contenido de sal, concentración de conservantes y tipo de sistema de envasado, teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento y transformación, las posibilidades de contaminación y la vida útil prevista.• Consulta de la bibliografía científica y de los datos de investigación disponibles acerca de los aspectos que caracterizan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en cuestión. |
| <i>Estudios complementarios: tendrán en cuenta la variabilidad inherente al producto, los microorganismos en cuestión y las condiciones de transformación y almacenamiento</i> |
| <ul style="list-style-type: none">• Modelos matemáticos de pronóstico establecidos para el alimento de que se trate, utilizando factores críticos de crecimiento o supervivencia aplicables a los microorganismos en cuestión presentes en el producto.• Pruebas para investigar la capacidad que tiene el microorganismo en cuestión, adecuadamente inoculado, para crecer o sobrevivir en el producto en diferentes condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles.• Estudios para evaluar el crecimiento o supervivencia de los microorganismos en cuestión que puedan estar presentes en el producto durante su vida útil en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización. |

La determinación de la duración de la vida útil es muy importante para la seguridad microbiológica de los alimentos listos para el consumo (ALC), en especial en aquellos alimentos en los que puede producirse crecimiento de *L. monocytogenes*.

Las empresas fabricantes de ALC deberán llevar a cabo estudios de vida útil y la revisión de sus planes APPCC en las siguientes circunstancias:

- Desarrollo de alimentos nuevos o modificados.
- Desarrollo de procesos nuevos o modificados.
- Desarrollo de nuevos envasados.
- Cualquier cambio significativo en los ingredientes y/o el envasado de los alimentos existentes.
- Cambios en las instalaciones o en el equipo de producción.
- Cuando previamente no hayan realizado estudios de vida útil.

Consideraciones previas

La empresa alimentaria es responsable de establecer la vida útil en unas condiciones definidas, las cuales deberían tener en cuenta las **condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso**.

Una parte importante de estas condiciones previsibles es la **temperatura** de almacenamiento durante toda la vida útil, y en consecuencia, se debe(n) justificar la(s) temperatura(s) elegida(s) para el estudio de vida útil.

Como norma, el uso de temperaturas de almacén demasiado bajas para establecer la vida útil, en comparación con las temperaturas reales de la distribución y uso, puede conducir a una subestimación del crecimiento microbiano, incluida *L. monocytogenes*, y a una consecuente sobreestimación de la duración de la vida útil.

Si la empresa desconoce las temperaturas reales de almacenamiento del producto en cuestión, puede aplicar, p.e. 8-12° C como temperatura de almacén en los estudios de vida útil. No obstante, las empresas alimentarias deben justificar qué temperaturas utilizan para establecer la vida útil, teniendo en cuenta datos de temperaturas durante la distribución y el almacenamiento por los consumidores.

En la práctica, el establecimiento de la vida útil se considera parte del sistema APPCC del fabricante, y tiene en cuenta:

- los controles sobre los proveedores que garanticen la calidad de las materias primas y la tendencia de los resultados de los controles de materias primas,
- la confianza en los controles de las Prácticas Correctas de Higiene aplicados en el ambiente de fabricación, reflejados en los resultados del muestreo de superficies y equipos de procesado,
- la experiencia del fabricante con productos similares,
- la velocidad de deterioro microbiológico y el mantenimiento de la calidad

La duración de la vida útil es parte integral de la seguridad del producto, y para valorar si ésta es segura, **resulta crítica la identificación de patógenos relevantes, incluida *L. monocytogenes*, en las materias primas y en el ambiente de producción**.

Es importante recordar que las desviaciones de las condiciones normales, tales como un elevado nivel de contaminación inicial de las materias primas, temperaturas demasiado elevadas durante el almacenamiento y el transporte, o una vida útil demasiado larga, podrían tener un impacto negativo significativo sobre la seguridad del producto.

Consideraciones previas

El objetivo de los estudios de vida útil para *L. monocytogenes* es demostrar que el ALC cumple con el límite del criterio de seguridad alimentaria establecido para este patógeno a lo largo de toda su vida útil.

La determinación de la vida útil microbiológica de los productos alimenticios siempre debe incluir la consideración de diferentes factores, tales como: sector alimentario, tipo de producto y tipo de proceso. La variabilidad inherente de los lotes fabricados y la variabilidad ligada a las especies de *L. monocytogenes* también debe tenerse en cuenta, así como todas las **condiciones razonablemente previsible durante la distribución, el almacenamiento y el uso, incluidas aquellas aplicadas por los consumidores.**

La demostración del cumplimiento y los estudios de vida útil pueden realizarse de diversas maneras, comenzando por comparar las características del producto con la bibliografía científica disponible.

Se necesitan **estudios complementarios** cuando la comparación de las características del producto con la bibliografía científica disponible u otros datos no permite proporcionar suficiente información para apoyar la evaluación de la vida útil. Estos estudios pueden incluir microbiología predictiva, el uso del histórico de datos adecuado o la realización de pruebas laboratoriales específicas, como los estudios de durabilidad y los ensayos de desafío. Cada una de estas herramientas tiene ventajas e inconvenientes, y pueden combinarse entre sí cuando sea necesario.

El Anexo 1 contiene un **árbol de decisiones que muestra un planteamiento esquemático de los pasos a seguir para aplicar los estudios de vida útil**. El árbol también indica a las empresas alimentarias cuando son necesarios estudios complementarios específicos (p.e. estudios de durabilidad o ensayos de desafío) con el fin de investigar el crecimiento (potencial) de *L. monocytogenes* en el alimento.

Para confirmar el mantenimiento de la vida útil definida para cada producto, es necesaria la vigilancia continua y la verificación de la misma.



1. Evaluación de la vida útil combinando diferentes herramientas

Se pueden distinguir **dos tipos de planteamientos**: el planteamiento del caso único y el planteamiento basado en el riesgo. En el [Anexo 2](#) se recoge un árbol de decisiones con ambos enfoques y ejemplos de su uso.

El **planteamiento del caso único** considera que, en el caso de contaminarse, el alimento contiene inicialmente un número dado de células bacterianas, que este alimento tiene unas características fijas y que se almacena en condiciones estáticas. En general, este enfoque proporciona información limitada e inadecuada, ya que estas condiciones no tienen en cuenta la variabilidad natural de los parámetros que pueden tener un impacto en la contaminación al final de la vida útil.

De hecho, la contaminación por *L. monocytogenes* puede tener distintas evoluciones de acuerdo con:

- El nivel de contaminación inicial (concentración inicial alta o baja).
- El estado fisiológico de las células contaminantes (estrés bacteriológico resultante en un mayor o menor periodo de latencia).
- La capacidad de crecimiento de la cepa bacteriana contaminante del alimento
- Las características del alimento (variabilidad de pH y actividad de agua dentro de un mismo lote y entre lotes diferentes), y
- Las condiciones de almacenamiento desde la distribución hasta el frigorífico doméstico.

Este planteamiento puede conducir a establecer una vida útil:

- Demasiado corta en el "peor escenario posible", es decir, cuando las hipótesis del estudio son excesivamente cautelosas (contaminaciones muy elevadas, cepas de crecimiento más rápido, ausencia de fase de latencia, alimento que más favorece el crecimiento, temperaturas de conservación muy altas), o
- Por el contrario, demasiado larga e insegura, p.e. cuando no se tienen en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso.

En cualquier caso, este enfoque puede ser suficiente para demostrar que, "en el peor escenario posible", el alimento cumplirá con el límite al final de su vida útil. Por tanto, la empresa puede estimar la contaminación final máxima al final de la vida útil, cuando la contaminación inicial es máxima, con un máximo potencial de crecimiento y en las peores condiciones de almacenamiento.

Si la contaminación máxima estimada no excede el límite, la vida útil se puede considerar segura. Por el contrario, si la contaminación máxima estimada excede el límite, se debe acortar la vida útil, o la empresa debe valorar la probabilidad de que esta vida útil supere el límite y valorar si esta probabilidad es o no aceptable. En este caso, se debe usar el **planteamiento basado en el riesgo** para estimar la distribución de la contaminación al final de la vida útil para todas las condiciones razonablemente previsibles. La empresa también debería considerar mejorar las condiciones higiénicas de las instalaciones y/o el estado microbiológico de los ingredientes, junto con la re-evaluación de la vida útil.

2. Colaboración entre empresas alimentarias

Las empresas alimentarias pueden colaborar entre ellas y buscar el asesoramiento de diversos laboratorios alimentarios (p.e. instituciones de investigación o laboratorios de referencia) cuando lleven a cabo estos estudios de vida útil.

Con independencia de esta colaboración, es importante que la empresa tenga en cuenta el ambiente de cada planta individual de fabricación. Las empresas que elaboren **productos similares en condiciones similares** pueden usar los resultados de los mismos estudios.

No obstante, el uso de un mismo estudio para productos obtenidos en diferentes plantas requiere considerar los siguientes aspectos:

- Los productos deben tener las mismas características (pH, a_w , contenido en sal, concentración de conservantes, tipo de envasado, microflora asociada o cualquier otra característica importante para la supervivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes*). Si una o varias características difieren, los estudios no pueden usarse sin evaluar el efecto de las diversas características en la supervivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- La formulación del producto debe ser la misma, y en caso contrario, debe evaluarse los efectos de los ingredientes sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- El proceso de producción debe ser similar. Las etapas del proceso se debe comparar con detalle y debe evaluarse el efecto de cualquier diferencia encontrada sobre la supervivencia y el crecimiento. Los estudios deben tener en cuenta la variabilidad inherente ligada al producto.
- Las condiciones de conservación y la vida útil deben ser similares, y en caso contrario, hay que evaluar el efecto de las diferencias sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, y
- La microflora asociada (iniciadores) debe ser idéntica, y en caso negativo, tener el mismo efecto sobre *L. monocytogenes*.

La empresa debe demostrar a la autoridad competente que los productos y los procesos de producción son similares, y **si los productos no son similares, la empresa debe demostrar cuales son las diferencias y qué efectos tienen sobre la supervivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes***. La empresa puede emplear la bibliografía científica disponible y datos de investigación como consulta.

3. Documentación de los estudios de vida útil

La empresa debe conservar la documentación de los estudios de vida útil y sus verificaciones como parte de las PCH y procedimientos APPCC.

La documentación debe incluir todos los datos necesarios que se hayan empleado para determinar la vida útil (características del producto, bibliografía científica usada, tipos y resultados de otros estudios de vida útil).

Es esencial que esta documentación esté disponible de forma inmediata, con el fin de que la empresa pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que sus alimentos listos para el consumo cumplen con el Reglamento comunitario hasta el final de su vida útil.

La empresa puede decidir el formato de esta documentación.



Características del producto y bibliografía científica

Dependiendo de cada situación, estos estudios pueden ser suficientes para evaluar el riesgo de los microorganismos patógenos; p.e., si el pH o la actividad de agua de un alimento no permiten el crecimiento de un patógeno, la duración de la vida microbiológica concernirá a la higiene y no a seguridad de los alimentos.

Se contemplan dos tipos de estudios obligatorios iniciales:

1. Características físico-químicas
2. Bibliografía científica



1. Características físico-químicas

Para determinar la vida útil de un ALC, es importante considerar si el alimento puede favorecer la supervivencia o el crecimiento de *L. monocytogenes*, lo que dependerá de las propiedades intrínsecas y extrínsecas del alimento:

1. Propiedades intrínsecas:

- Características físico-químicas:
 - pH
 - a_w
 - contenido en sal
 - concentración de conservantes
 - humedad
 - estructura (sólido, líquido)
- Microflora habitual asociada (recuento total) o específica (bacterias ácido-lácticas, *Pseudomonas*)

2. Propiedades extrínsecas:

- Vida útil prevista: tiempo y temperatura de conservación
- Sistema de envasado: aire, vacío, atmósfera modificada.
- Condiciones razonablemente previsibles de almacén, transformación y consumo, incluidas las posibilidades de contaminación

Las características más importantes son el pH, la actividad de agua (a_w) y el tiempo/temperatura de conservación, por lo que se deben describir y ser representativas de la variabilidad del alimento. Además, también pueden tener un impacto importante los aditivos conservantes y la microflora protectora, incluyendo los posibles cultivos iniciadores.

Conociendo estas características, la empresa alimentaria puede determinar si es posible la supervivencia o el crecimiento de *L. monocytogenes* en un ALC concreto. Esta información también podría ayudar a la empresa a reformular sus productos para prevenir o minimizar la supervivencia o el crecimiento de *L. monocytogenes*.

La legislación clasifica automáticamente un ALC en la categoría de alimentos que NO pueden favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* cuando se cumple alguna de las siguientes características:

- con $\text{pH} \leq 4,4$
- con $a_w \leq 0,92$
- con $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$
- con una vida útil inferior a 5 días.

En el [Anexo 8](#) se recopilan los valores de actividad de agua y de pH publicados para distintos tipos de alimentos, a modo de ejemplos orientativos.

2. Bibliografía científica

Se dispone de una amplia fuente de datos sobre *L. monocytogenes* y vida útil en libros, revistas científicas y publicaciones de universidades e instituciones técnicas. Muchas entidades nacionales, europeas (p.e. EFSA) e internacionales también disponen de datos al respecto.

Cuando una empresa alimentaria ha establecido las características de su ALC y las condiciones en las que se produce, envasa y almacena, puede comparar esta información con los datos existentes en la bibliografía científica.

En la tabla 2 se recogen algunos límites para la supervivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes*, basados en investigaciones llevadas a cabo principalmente en laboratorio bajo condiciones óptimas, por lo que sólo deben usarse como estimaciones del impacto en los alimentos. Otros factores, o combinaciones de los mismos, también podrían ser relevantes, siempre que tengan justificación científica.

Tabla 2. Algunos factores que afectan a la supervivencia y crecimiento de *L. monocytogenes*

| Factores | Puede crecer | | | Puede sobrevivir * (pero no crecer) |
|--|---|---------------------|-----------------|--|
| | Límite inferior | Óptimo (más rápido) | Límite superior | |
| Temperatura (° C) | -1.5 a +3.0 | 30.0 a 37.0 | 45.0 | -18.0 |
| pH ** | 4.2 a 4.3 | 7.0 | 9.4 a 9.5 | 3.3 a 4.2 |
| Actividad de agua (a _w) | 0.90 a 0.93 | 0.99 | > 0.99 | < 0.90 |
| Concentración de sal (%) *** | < 0.5 | 0.7 | 12-16 | ≥ 20 |
| Atmósfera | Anaerobio facultativo (puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno, p.e. en envases al vacío o en atmósfera modificada) | | | |
| Tratamiento térmico durante la elaboración | Se requiere una combinación de temperatura/tiempo de 70° C durante 2 minutos para una reducción D-6 (es decir, 10 ⁶ o de 6 decimales) del número de células de <i>L. monocytogenes</i> . Otras combinaciones tiempo/temperatura también podrían lograr la misma reducción. | | | |

* El periodo de supervivencia variará dependiendo de la naturaleza del alimento y de otros factores.

** La inhibición de *L. monocytogenes* dependerá del tipo de ácido presente.

*** Basada en el porcentaje de cloruro sódico, fase acuosa.

L. monocytogenes tiene unas características que aumentan su importancia como microorganismo causante de enfermedades de origen alimentario. Es capaz de crecer a 0° C, por lo que **se reproduce bien en los alimentos refrigerados**. También puede sobrevivir en ambientes hostiles, como desecados y salados. Además, es capaz de crecer con bajas concentraciones de oxígeno, e incluso sin oxígeno disponible, lo que le supone una ventaja en los **envases al vacío**.

Estudios complementarios

Se realizarán **tomando como base las características del producto y la bibliografía científica**, y tendrán en cuenta la variabilidad inherente al producto, los microorganismos en cuestión y las condiciones de transformación y almacenamiento.

Se contemplan tres tipos de estudios:

1. Histórico de datos
2. Microbiología predictiva (modelos matemáticos)
3. Pruebas de laboratorio específicas:
 - 3.1. Estudios de durabilidad
 - 3.2. Ensayos de desafío

De forma general, las pruebas realizadas en laboratorio pueden no ser totalmente representativas del alimento real. Por tanto, con frecuencia **en la práctica resulta de interés utilizar estas fuentes asociadas**, dadas las limitaciones de cada una de ellas.



1. Histórico de datos

El histórico de datos forma parte de los registros que deben guardar las empresas alimentarias. Algunos de estos datos se registran como parte de las obligaciones legales de las empresas en el marco de la legislación sobre seguridad alimentaria, como la trazabilidad, los sistemas APPCC y los planes de autocontroles, incluyendo la calidad de las materias primas, el muestro de superficies y áreas de procesado (para demostrar la eficacia del plan de limpieza y desinfección de la fábrica) y el análisis de alimentos, en particular en el día de fabricación y al final de su vida útil (para verificar el funcionamiento eficaz del sistema APPCC y para verificar la duración de la vida útil, respectivamente).

El histórico de datos es útil para determinar la vida útil de los ALC por las siguientes razones:

- El histórico de datos indica los niveles de *L. monocytogenes* que se encuentran en el ambiente de producción, las materias primas y los ALC existentes, bajo las prácticas correctas de higiene y sistemas APPCC vigentes en las empresas.
- El histórico de datos sobre los niveles de *L. monocytogenes* existentes en los ALC al principio y al final de la vida útil pueden emplearse para valorar su potencial de crecimiento en ALC similares, con características intrínsecas comparables (pH, aw, microflora, etc.), producidos bajo condiciones prácticamente idénticas.
- El histórico de datos sobre los niveles de *L. monocytogenes* existentes en los ALC al principio y al final de la vida útil también se emplean mucho en la práctica para verificar la duración del alimento y confirmar que la vida útil establecida es apropiada cuando se almacena, manipula y utiliza de forma razonablemente previsible, y
- El histórico de datos generado durante un periodo de tiempo para ALC comparables y que continúan generándose con una frecuencia regular puede usarse para un análisis de tendencias. Cuando los niveles de *L. monocytogenes* en ALC al final de la vida útil son consistentemente bajos o ausentes, y no se han obtenido resultados superiores a 100 ufc/g, estos datos pueden usarse en combinación con datos de muestreo de superficies y de calidad de materias primas para proporcionar un nivel suficiente de confianza en que dichos ALC no poseen un riesgo para la salud pública. El nivel de confianza aumenta con la cantidad de datos disponible. **Cuanto más unidades del alimento se hayan analizado, más fiable será el histórico de datos.**

Las empresas alimentarias deben garantizar, a satisfacción de las autoridades competentes, que su histórico de datos es suficiente para demostrar que los ALC no excederán el límite de 100 ufc/g durante la vida útil. Las autoridades competentes pueden requerir que estos datos se completen con otros estudios complementarios.

2. Microbiología predictiva (Modelos matemáticos)

La microbiología predictiva (modelos matemáticos) tiene como objetivo predecir el comportamiento de los microorganismos en los alimentos durante su fabricación o almacenamiento. Se basa en el desarrollo de ecuaciones matemáticas que permiten simular y prever el comportamiento de la flora alterante y de los patógenos en los productos alimenticios. En años recientes ha habido avances significativos en este campo, en especial para estimar el crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos.

Los parámetros de las ecuaciones matemáticas se pueden haber determinado a partir de pruebas realizadas con los alimentos, o a partir de curvas de crecimiento en medios líquidos, o lo más frecuente, a partir de ambas fuentes:

- Los **modelos obtenidos en medios microbiológicos líquidos** se usan para describir el posible impacto de varios factores; algunos pueden no describir con precisión el comportamiento microbiano en el alimento, ya que, en un medio líquido, las bacterias ocupan la totalidad del volumen, mientras que en el interior de un alimento sólido, forman unas colonias de volumen limitado; los modelos más robustos han sido validados en alimentos.
- Los **modelos desarrollados en alimentos** pueden describir eficazmente el impacto de las condiciones de conservación en un alimento específico, pero es cuestionable su capacidad para describir el impacto de la variabilidad de las características físico-químicas del alimento o para hacer predicciones en otros alimentos.
- También se han desarrollado algunos **modelos intermedios**, para tratar de superar las limitaciones de estos dos acercamientos principales.

Los datos y modelos disponibles en la bibliografía se han incorporado a **programas informáticos** de uso amigable, algunos de los ampliamente utilizados y gratuitos son:

- [Growth Predictor](#), del Instituto de Investigación en Alimentos del Reino Unido.
- [Pathogen Modelling Programme](#), del Departamento de Agricultura de Estados Unidos
- [ComBase Predictor](#), resultado de la colaboración entre Reino Unido, Estados Unidos y Australia.

Algunos de estos modelos se han desarrollado para predecir el comportamiento del microorganismo cuando se conocen las características físico-químicas del alimento (p.e. pH, actividad de agua, concentraciones de ácidos orgánicos) y la temperatura de conservación. Otros modelos se han desarrollado para predecir el comportamiento de los microorganismos en alimentos particulares, cualquiera que sean sus condiciones de conservación. El [Anexo 3](#) muestra un ejemplo del uso de la microbiología predictiva.

Estudios complementarios

Siempre que se conozcan sus limitaciones y sea usados con precaución por personal experto, los modelos predictivos son una valiosa herramienta para estimar el crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos:

- Los modelos "crecimiento/no crecimiento", que predicen la probabilidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos, pueden ayudar a las empresas alimentarias a categorizar sus ALC.
- Los modelos que predicen los tiempos de latencia y la velocidad de crecimiento en alimentos pueden ayudar a las empresas alimentarias a evaluar el crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos durante su conservación, teniendo en cuenta la variabilidad de las cepas, el procesamiento inherente y la variabilidad del alimento y de las condiciones de conservación.

En la práctica, la microbiología predictiva puede ser útil para las siguientes aplicaciones:

- Predecir el crecimiento bacteriano en distintas condiciones.
- Predecir la probabilidad de crecimiento del microorganismo en el alimento.
- Estimar el nivel de contaminación en un día dado de la vida útil.
- Probar la variabilidad entre dos lotes.
- Optimizar la formulación (aditivos, pH, sal) para garantizar una mejor estabilidad-
- Evaluar el impacto de las roturas de la cadena del frío, y probar diferentes escenarios de conservación.
- Ayudar a identificar Puntos de Control Críticos de un proceso.

3. Pruebas de laboratorio específicas

Las empresas alimentarias deben escoger las pruebas microbiológicas a realizar, en colaboración con el laboratorio que las llevará a cabo. La elección debe estar guiada por la información a obtener, según se ilustra en la figura 1.

Algunas reglas básicas para la elección son:

- Es probable que los **ensayos de desafío para valorar el potencial de crecimiento** sean la primera opción en la mayoría de los casos, en especial para diferenciar entre alimentos que pueden o no favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- Los **ensayos de desafío para valorar la velocidad máxima de crecimiento** deberían considerarse en su mayoría como la segunda opción, en casos específicos en los que es de esperar que sea útil la información que facilitan. Se requieren conocimientos básicos de microbiología predictiva para interpretar sus resultados.
- Los **estudios de durabilidad** son particularmente apropiados cuando la prevalencia de *L. monocytogenes* es elevada.

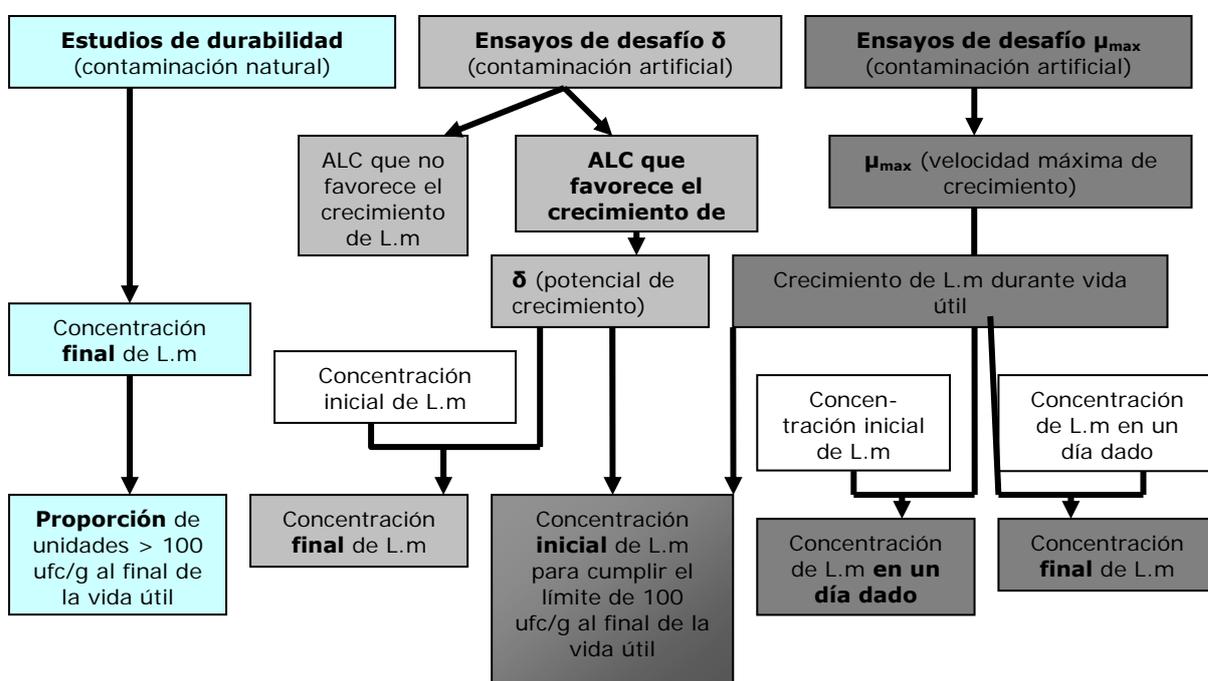


Figura 1. Datos obtenidos de los ensayos de desafío y los estudios de durabilidad

3.1. Estudios de durabilidad

Los estudios de durabilidad permiten evaluar el crecimiento de *L. monocytogenes* en un alimento contaminado de forma natural durante su conservación en condiciones razonablemente previsibles. Consisten en someter al alimento a las condiciones de tiempo y temperatura que correspondan con las "razonablemente previsibles" de transporte, de distribución y de empleo por el consumidor final. Al final de la vida microbiológica, se verifica que los microorganismos de interés no sobrepasan los límites reglamentarios.

Los estudios de durabilidad pueden considerarse **más realistas que los ensayos de desafío** para los alimentos individuales, ya que se trata de una contaminación presente de forma natural. **Cuando se realizan en el marco de los autocontroles, son útiles para vigilar la calidad sanitaria del conjunto de la cadena de producción.**

No obstante, los estudios de durabilidad tienen las siguientes **limitaciones**:

- Si en el alimento contaminado de forma natural la distribución de los microorganismos es heterogénea, no se puede cuantificar con precisión la evolución (positiva o negativa) de su número. La comparación de los recuentos obtenidos al principio y al final de la vida del alimento solo permiten una aproximación global a la evolución de las poblaciones en el curso de la duración de la vida útil. Esta limitación puede compensarse mediante la acumulación de resultados.
- Si el porcentaje de productos contaminados de forma natural por el microorganismo de interés es escaso, o si el nivel de contaminación inicial es escaso en la gran mayoría de los productos, pero mucho más elevado en algún producto en raras ocasiones, sería necesario un gran número de pruebas (quizás un número irrealizable) para obtener una información utilizable.
- Es difícil probar el conjunto de las condiciones previsibles (todos los perfiles térmicos, todas las formulaciones...), así como tener en cuenta la variabilidad de los productos de un lote a otro, e incluso dentro de un mismo lote.

La interpretación de los resultados puede ser difícil debido a la baja probabilidad de analizar una unidad contaminada, el muy escaso número de *L. monocytogenes* presente inicialmente y a la distribución heterogénea en el alimento.

En consecuencia, **los estudios de durabilidad pueden usarse cuando *L. monocytogenes* se detecta de forma rutinaria en el alimento analizado al final de proceso de fabricación** (estudios de durabilidad con cuantificación inicial).

En otros casos, esta verificación no permite saber si el cumplimiento de los límites se debe a la ausencia inicial del microorganismo, a su presencia en una fase de crecimiento lento, a una falta de crecimiento, o incluso hasta a una mortalidad. Por ello, **podría ser necesario un ensayo de desafío** para recoger la información necesaria para establecer la vida útil y asegurar el cumplimiento del límite de 100 ufc/g al final de la vida útil del alimento.

Para realizar un estudio de durabilidad se tienen que considerar el método de muestreo, las condiciones de almacenamiento y el método de recuento para *L. monocytogenes*. El protocolo para realizarlo se describe en el [Anexo 4](#).

3.2. Ensayos de desafío

Estas pruebas permiten conocer la evolución cuantitativa, en el transcurso del tiempo, de un inóculo de la especie bacteriana estudiada, añadido voluntariamente al alimento. Por tanto, estas pruebas permiten cuantificar el crecimiento bacteriano en sentido estricto.

Los ensayos de desafío pueden aportar información sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* cuando se incorpora de forma artificial en un alimento, bajo unas condiciones de conservación dadas. Pueden tener en cuenta la variabilidad de los alimentos (usando diferentes lotes) y las contaminación específica del alimento (inoculando cepas aisladas del alimento).

Los ensayos de desafío pueden realizarse con **dos objetivos** diferentes: valorar el **potencial de crecimiento** (es decir, la capacidad de *L. monocytogenes* para crecer en el alimento), o bien estimar parámetros de este crecimiento (p.e. velocidad máxima de crecimiento).

No obstante, en estas pruebas resulta difícil imitar el nivel de contaminación y su distribución heterogénea, y el estado fisiológico de las bacterias. En concreto, tienen las siguientes **limitaciones**:

- Resulta complicado reproducir las peculiaridades de una contaminación natural de forma artificial: puede suceder que el inóculo no tenga ningún competidor, por ejemplo cuando se inoculan cepas bacterianas purificadas en un producto que ha sido sometido a tratamiento térmico; en general, se requiere una concentración bacteriana más elevada que en la contaminación natural; y la inoculación no permite siempre reproducir la distribución espacial ni el estado fisiológico de las células (p.e. como consecuencia de un estrés) en el alimento contaminado de forma natural.
- Es difícil reproducir los cambios que tienen lugar en los productos alimenticios que evolucionan a lo largo de su vida microbiológica.
- Como en los estudios de durabilidad, es difícil probar el conjunto de las condiciones previsibles (todos los perfiles térmicos posibles, todas las formulaciones...), así como tener en cuenta la variabilidad de los productos de un lote a otro, e incluso dentro de un mismo lote.

3.2.1. Ensayos de desafío para el potencial de crecimiento

Un ensayo de desafío microbiológico para valorar el potencial de crecimiento (δ) es un **estudio laboratorial que mide el crecimiento de L. monocytogenes en un alimento contaminado artificialmente, conservado en las condiciones previsibles de transporte, distribución y almacenamiento.**

Un ensayo de desafío microbiológico debe reflejar las **condiciones reales esperables** a lo largo de la cadena del frío, incluyendo las condiciones de conservación desde la producción **hasta el consumo.**

El potencial de crecimiento (δ) es la diferencia entre el \log_{10} ufc/g al final de la prueba y el \log_{10} ufc/g al principio de la misma. Los resultados experimentales pueden mostrar una amplia dispersión, sobre todo porque se incluye la fase de latencia.

El potencial de crecimiento depende de muchos factores, entre los cuales la **temperatura** es el que más influye sobre el crecimiento de L. monocytogenes en un alimento dado:

- La(s) cepa(s) inoculada(s)
- el estado fisiológico de las cepas inoculadas
- las propiedades intrínsecas del alimento (p.e. pH, contenido de NaCl, aw, contenido nutricional, microflora asociada, constituyentes antimicrobianos)
- las propiedades extrínsecas (p.e. perfil tiempo/ temperatura, atmósfera).

En el marco del Reglamento (CE) nº 2073/2005, el potencial de crecimiento puede utilizarse para:

- Clasificar un alimento:
 - Cuando $\delta > 0.5 \log_{10}$ ufc/g, el alimento se clasifica como "Alimento listo para el consumo que puede favorecer el crecimiento de L. monocytogenes, distinto de alimentos destinados a lactantes y a usos médicos especiales" (categoría 1.2).
 - Cuando $\delta \leq 0.5 \log_{10}$ ufc/g, el alimento se clasifica como "Alimento listo para el consumo que NO puede favorecer el crecimiento de L. monocytogenes, distinto de alimentos destinados a lactantes y a usos médicos especiales" (categoría 1.3).
- Cuantificar el comportamiento de L. monocytogenes en un alimento de la categoría 1.2, de acuerdo con las condiciones definidas como razonablemente previsibles entre la producción y el consumo.
- Calcular la concentración de L. monocytogenes en el punto de producción, que no conduciría a superar el nivel de 100 ufc/g al final de la vida útil (es decir, fijar un límite intermedio entre ausencia en 25 g y 100 ufc/g)

Las **ventajas** principales de este método son su relativa facilidad de ejecución y que los resultados se pueden aplicar directamente (ver arriba).

Estudios complementarios

Su **inconveniente** es la falta de flexibilidad en la interpretación: **los resultados solo son válidos para el alimento estudiado en las condiciones estudiadas**, por lo que hay que realizar nuevas pruebas cada vez que haya un cambio (p.e. modificación de la receta, uso de diferentes perfiles tiempo/temperatura...). Además, el potencial de crecimiento cubre en general un largo periodo de tiempo (p.e. toda la vida útil) y por lo tanto no puede usarse para predecir el crecimiento durante un periodo de tiempo limitado.

Para realizar un ensayo de desafío que valore el potencial de crecimiento, se deben considerar como mínimo los siguientes factores:

- Características del alimento, incluida la vida útil
- Número de lotes
- Elección de cepa(s)
- Preparación del inóculo
- Preparación e inoculación de las unidades de prueba
- Condiciones de conservación
- Medición de características físico-químicas
- Análisis microbiológicos
- Cálculo del potencial de crecimiento

El protocolo de trabajo para los laboratorios se describe en el [Anexo 5](#), junto con algunos ejemplos.

3.2.2. Ensayos de desafío para la velocidad máxima de crecimiento

Un ensayo de desafío microbiológico para valorar la velocidad máxima de crecimiento es un **estudio laboratorio que mide la velocidad de crecimiento de L. monocytogenes en un alimento inoculado artificialmente, conservado a una temperatura apropiada**. La temperatura usada en la prueba no tiene que ser (necesariamente) la misma usada para las predicciones, ya que el posible predecir el crecimiento a otra temperatura distinta de la probada, o a lo largo de un perfil tiempo-temperatura elegido para ser representativo de las condiciones previsibles de transporte, distribución y almacenamiento.

Una vez realizada la prueba, la velocidad máxima de crecimiento de la cepa de L. monocytogenes estudiada a la temperatura estudiada se calcula a partir de la curva de crecimiento. En la fase de crecimiento exponencial, el trazado del logaritmo natural del número de células en función del tiempo produce una línea recta. La pendiente de esta línea es la μ_{\max} .

La velocidad máxima de crecimiento es un parámetro importante de la curva de crecimiento, que depende de:

- La(s) cepa(s) inoculada(s)
- las propiedades intrínsecas del alimento (p.e. pH, contenido de NaCl, aw, contenido nutricional, microflora asociada, constituyentes antimicrobianos)
- las propiedades extrínsecas (p.e. perfil tiempo/ temperatura, atmósfera).

Por lo tanto, usando la ecuación sugerida en este documento, es posible extrapolar esta μ_{\max} a una temperatura para predecir otros valores μ_{\max} a distintas temperaturas en el mismo alimento.

Los ensayos de desafío para calcular la velocidad máxima de crecimiento permiten:

- Estimar la concentración de L. monocytogenes en un día determinado de la vida útil, si se conoce la concentración inicial.
- Estimar la máxima concentración permisible de L. monocytogenes en un alimento que puede estar presente el día de la producción, con el fin de cumplir con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil (es decir, fijar límites

Estas pruebas son **más caras y requieren más tiempo**, por lo que se limitarán a los casos en que sea de utilidad aplicar microbiología predictiva obtener las estimaciones arriba descritas, y se llevarán a cabo preferentemente por laboratorios con experiencia en microbiología predictiva.

Los inconvenientes de las pruebas para valorar el potencial de crecimiento se pueden solventar combinando modelos microbiológicos predictivos y ensayos de desafío para valorar la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}).

En el [Anexo 6](#) se describe el protocolo para realizar estas pruebas y ejemplos de las mismas.

Bibliografía

AESAN, 2011. Informe del Comité Científico de la AESAN en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios.
http://www.aesan.mssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/LISTERIA_M.VIDA_UTIL.pdf

AFSSA, 2005. Avis n° 2003-SA-0362 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur la révision de l'avis 2000-SA-0094 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance. Disponible en francés en:
<http://www.anses.fr/Documents/MIC2003sa0362.pdf>

DOCE, 2005. Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DOCE L 338 de 22.12.2005. Modificado por:

Reglamento (CE) no 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 (DOCE L 322 de 7.12.2007)

Reglamento (UE) no 365/2010 de la Comisión de 28 de abril de 2010 (DOCE L 107 de 29.4.2010)

Versión consolidada disponible en castellano en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20100519:ES:PDF>

CausasCientia. Calculadora disponible en inglés en:
http://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html

CE, 2008 a. Commission Staff Working Document.- Guidance Document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Disponible en inglés en:
http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_listeria_monocytogenes_en.pdf

CE, 2008 b. Technical Guidance Document On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Working Document. Version 2 – November 2008. Disponible en inglés en:
http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/shelflife_listeria_monocytogenes_en.pdf

Codex Alimentarius, 2004. Directrices generales sobre muestreo. CAC/GL 50-2004. Disponible en castellano en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10141/CXG_050s.pdf

ComBase Predictor. Agencia de Estándares de Alimentos (FSA), Reino Unido; Instituto de Investigación en Alimentos (IFR), Reino Unido; Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura (USDA ARS) y su Centro Regional del Oriente (ERRC), Estados Unidos; y Centro Australiano de Excelencia en Inocuidad Alimentaria, Australia. Disponible en castellano en: <http://www.combase.cc/predictor.html>

Growth Predictor. Instituto de Investigación en Alimentos (IFR- Institute of Food Research), Reino Unido. Disponible en inglés en: <http://www.ifr.ac.uk/safety/growthpredictor/>

MicroFit. Disponible en inglés en: <http://www.ifr.ac.uk/microfit/>

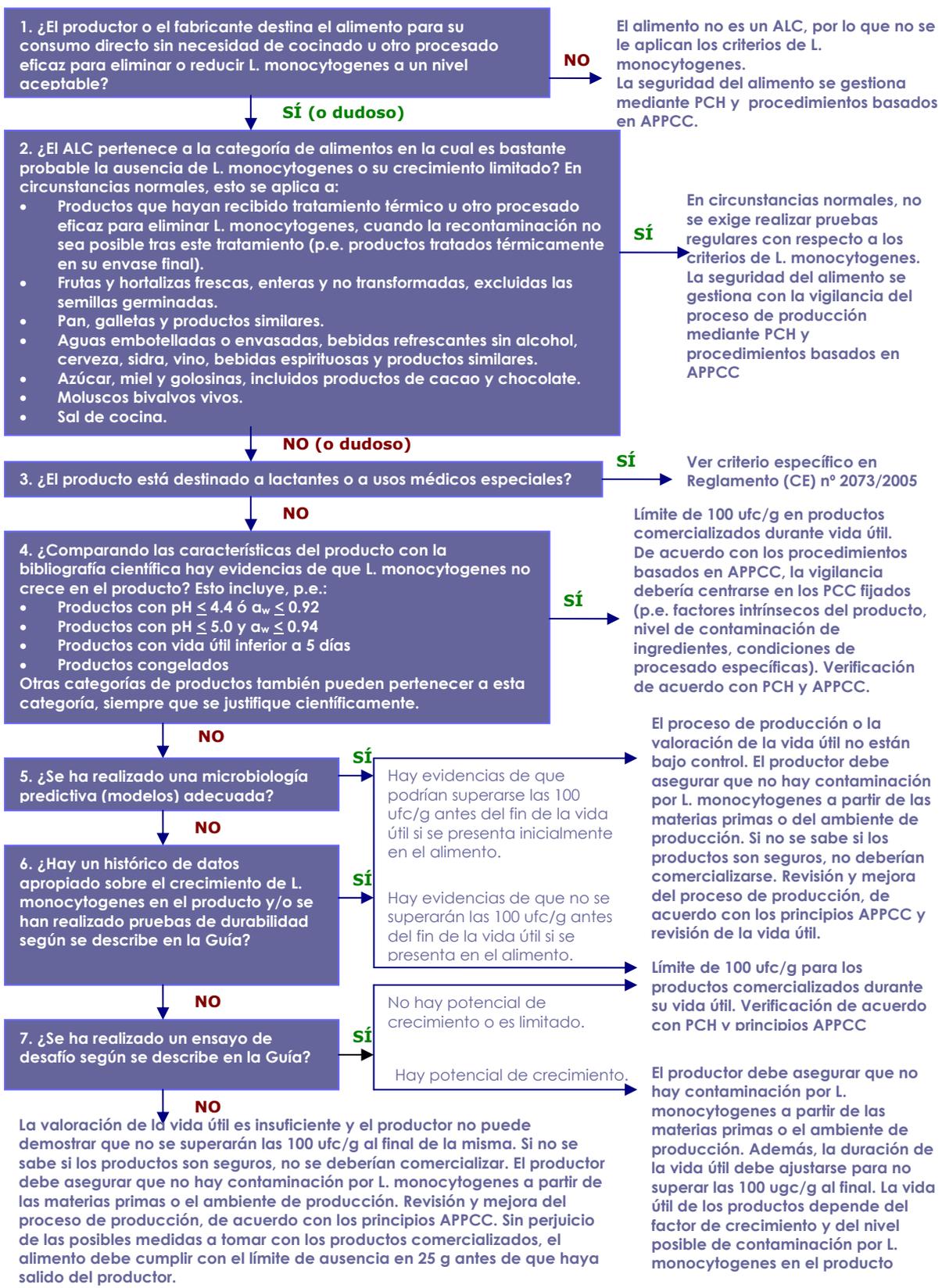
Pathogen Modelling Programme. Departamento de Agricultura (USDA), Estados Unidos. Disponible en inglés en: <http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550>

Ratkowsky et al., 1982. Relationship Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures. *Journal of Bacteriology*, Jan. 1982, p. 1-5

Zwietering et al., 1996. Model for the Combined Effects of Temperature, pH, and Sodium Lactate on Growth Rates of *Listeria innocua* in Broth and Bologna-Type Sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, May 1996, p. 1616–1622

Anexos

Anexo 1. Árbol de decisiones para realizar estudios de vida útil



Anexo 1

EJEMPLO DE APLICACIÓN DEL ÁRBOL

Pregunta 1:

La primera pregunta a responder por la empresa es si hay evidencias de que el alimento será cocinado o procesado de forma eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable antes del consumo. En este caso, al alimento no le es de aplicación ningún criterio específico en relación con *L. monocytogenes*, ya que no se considera un ALC. La seguridad alimentaria debería gestionarse aplicando PCH y procedimientos basados en el APPCC, lo cuales deberían incluir el control del estado microbiológico de las materias primas, minimizar la contaminación inicial a nivel de fabricación, control del proceso de producción, etc.

Pregunta 2:

La segunda pregunta a responder por la empresa es si hay evidencias de la probable ausencia de *L. monocytogenes* en el alimento o de su crecimiento limitado.

En circunstancias normales, de acuerdo con la nota al pie 4 del Anexo I del Reglamento CE nº 2073/2005, los siguientes ALC se incluyen en este grupo:

- Productos que hayan recibido tratamiento térmico u otro procesado eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (p.e. productos tratados térmicamente en su envase final).
- Frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas, excluidas las semillas germinadas.
- Pan, galletas y productos similares.
- Aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares.
- Azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate.
- Moluscos bivalvos vivos.
- Sal de cocina.

Para estos productos, no se exige realizar pruebas regulares de *L. monocytogenes*. La seguridad alimentaria se gestiona vigilando los PCC del proceso de producción (p.e. tratamiento térmico). Las pruebas de *L. monocytogenes* al final de la vida útil pueden usarse para verificar la eficacia del plan APPCC.

Pregunta 3:

Cuando se producen o manipulan productos destinados a lactantes o a usos médicos especiales, se debe aplicar un criterio específico para *L. monocytogenes* (ausencia en 25 g, n = 10, c = 0).

Anexo 1

Pregunta 4:

Si la empresa tiene evidencias científicas de que *L. monocytogenes* no crece en el producto, se debe aplicar el límite de 100 ufc/g cuando el producto esté comercializado.

De acuerdo con la nota al pie 8 del Anexo I del Reglamento (CE) n° 2073/2005, los siguientes productos se podrían incluir directamente en este grupo:

- Productos con $\text{pH} < 4.4$ ó $a_w < 0.92$
- Productos con $\text{pH} < 5.0$ y $a_w < 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Otros productos científicamente justificados, como los productos congelados

También se considera que no son capaces de favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* los productos mencionados en la nota al pie 4 del Reglamento (ver pregunta 2).

Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

De acuerdo con los procedimientos APPCC, la seguridad alimentaria se debería gestionar mediante la vigilancia de los PCCs fijados (p.e. vigilancia de los factores intrínsecos del producto, como a_w y pH). El control del nivel de contaminación inicial de materias primas e ingredientes, y las PCH (contaminación cruzada, etc.) tienen que garantizar que el nivel de *L. monocytogenes* no excederá las 100 ufc/g durante la vida útil del producto.

Preguntas 5 y 6:

Cuando no pueda excluirse el crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto en base a justificaciones científicas o según lo establecido en las notas al pie 4 y 8 del Reglamento, la empresa debe realizar estudios complementarios para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil, usando el histórico de datos, microbiología predictiva, estudios de durabilidad o ensayos de desafío.

Cuando estos estudios se hayan realizado según lo descrito en la Guía y haya datos adecuados de que el alimento no superará las 100 ufc/g de *L. monocytogenes* al final de su vida útil, la empresa habrá sido capaz de demostrar el cumplimiento de este límite. La seguridad alimentaria debería gestionarse aplicando PCH e implantando y vigilando PCCs apropiados, y controlando el nivel de contaminación inicial de materias primas e ingredientes. Las pruebas de *L. monocytogenes* se deberían usar para verificar las PCH y los procedimientos basados en el APPCC.

Cuando los datos indiquen que es probable exceder el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil, la empresa no puede demostrar que cumple el Reglamento y, de acuerdo con los principios APPCC, el proceso de producción y la determinación de la vida útil inicial deben revisarse y mejorarse. Esto debe incluir el control de la calidad microbiológica de materias primas e ingredientes, la reducción del potencial de crecimiento de *L. monocytogenes*, el ajuste de factores intrínsecos del producto final, tratamiento térmico adicional, etc.

Anexo 1

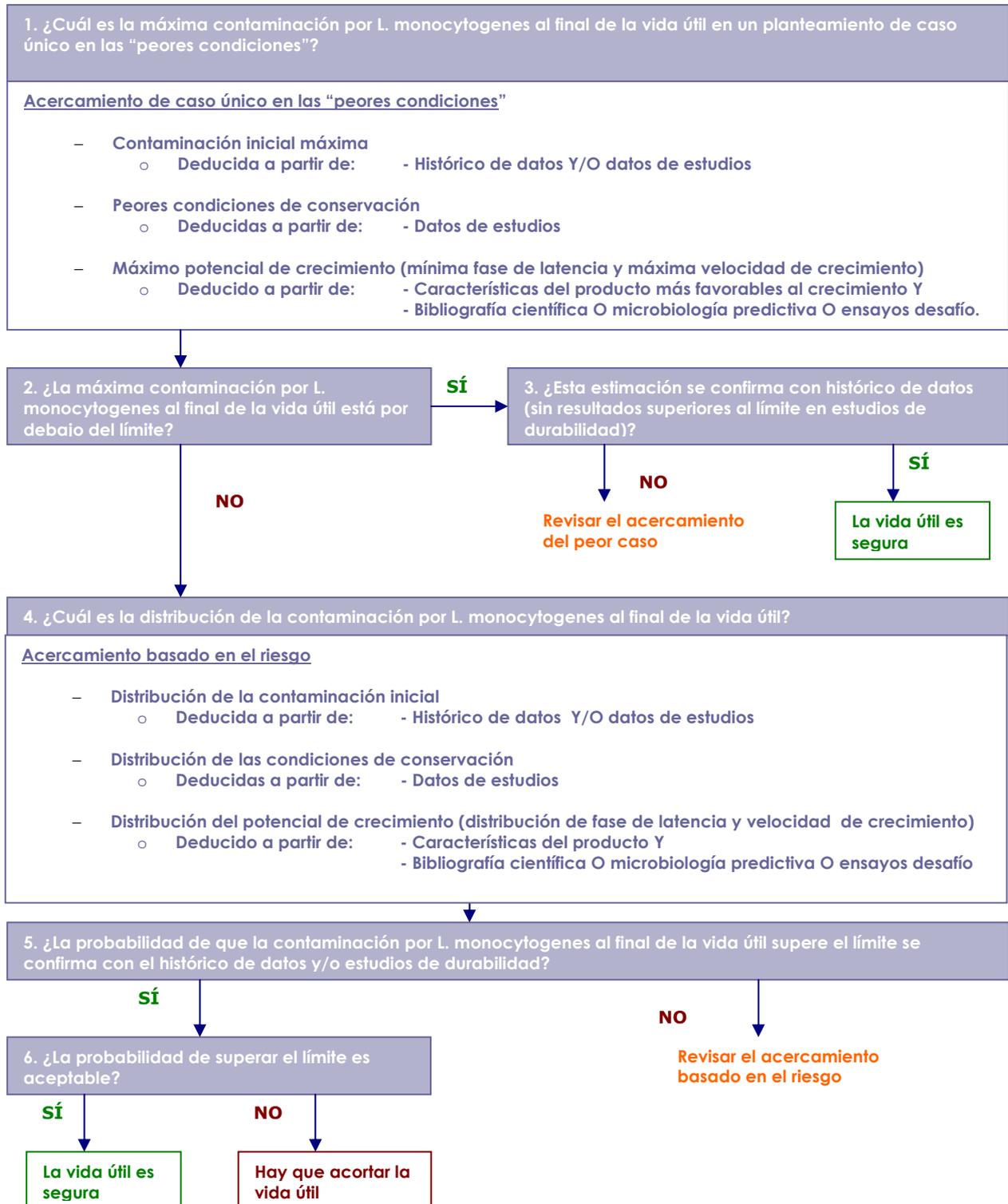
Pregunta 7:

Cuando se haya realizado un ensayo de desafío según se describe en la Guía y no se haya encontrado ningún potencial de crecimiento durante la vida útil estimada, se debe aplicar un límite de 100 ufc/g a este producto. La seguridad alimentaria debería gestionarse aplicando PCH y procedimientos basados en el APPCC. Las pruebas de *L. monocytogenes* con respecto a este criterio deben usarse como verificación de las PCH y los procedimientos basados en APPCC.

Cuando el ensayo de desafío evidencie que hay un potencial de crecimiento de *L. monocytogenes*, la empresa debe ajustar la vida útil para garantizar el cumplimiento del límite de 100 ufc/g durante toda la vida útil. Las pruebas de *L. monocytogenes* con respecto a este criterio deben usarse como verificación de las PCH y los procedimientos basados en los principios del APPCC.

Cuando no se disponga de información sobre el producto y el posible crecimiento de *L. monocytogenes* en el mismo, no se puede garantizar el cumplimiento del criterio de *L. monocytogenes*, y por tanto, la seguridad del producto. En este caso, se tiene que revisar y mejorar el proceso de producción, incluyendo las especificaciones de materias primas, ingredientes, etc., de acuerdo con los principios APPCC. La empresa debe cumplir con el límite de ausencia en 25 g antes de que el producto salga del productor.

Anexo 2. Árbol de decisiones para valorar la vida útil



Anexo 2

EJEMPLOS DE VALORACIÓN DE VIDA ÚTIL COMBINANDO DIFERENTES HERRAMIENTAS

A continuación se describen las características del producto usado en los ejemplos 1-3:

- pH medio = 5.97 ± 0.05
- a_w media = 0.960 ± 0.012
- Contaminación inicial máxima (*) = 1 ufc/g
- Velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) y periodo de latencia para un producto idéntico con pH = 6.03 y $a_w = 0.959$ a 10° C (datos extraídos de la bibliografía, modelos predictivos o ensayos de desafío):
 - o $\mu_{max} = 0.3 \log_{10}$ ufc/g por día
 - o Latencia = 4.4 días

(*) máximo o mínimo = en este caso, muy baja probabilidad (< 5%) de superar este valor

Ejemplo 1. Vida útil de 10 días a 6° C (planteamiento de caso único)

Este ejemplo describe un enfoque de caso único para una vida útil de 10 días a una temperatura de conservación de 6° C.

Para una temperatura máxima de conservación de 6° C, el periodo medio de latencia será de 14 días y la velocidad media de crecimiento será de $0.12 \log_{10}$ ufc/g por día. Teniendo en cuenta las características físico-químicas del producto y el comportamiento de las cepas de *L. monocytogenes*, podemos evaluar:

- Período de latencia mínimo* = 5.4 días
- Velocidad máxima de crecimiento* = $0.20 \log_{10}$ ufc/g por día

Para una concentración inicial de máxima de 1 ufc/g (es decir, $0 \log_{10}$ ufc/g), la concentración final será:

$$0 + (10 - 5.4) \times 0.20 = 0.92 \log_{10} \text{ ufc/g, es decir, } 8 \text{ ufc/g}$$

Incluso para un tiempo de latencia igual a cero, la concentración final sería:

$$0 + 10 \times 0.20 = 2 \log_{10} \text{ ufc/g, es decir, } 100 \text{ ufc/g}$$

En este caso, el enfoque del caso único es suficiente para demostrar que no se excederá el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

Anexo 2

Ejemplo 2. Vida útil de 28 días, con 10 días a 4° C y 18 días a 8° C

Planteamiento del caso único

- Período de latencia mínimo* = 11 días a 4° C, y 0.4 días a 8° C (después de 10 días a 4° C)
- Velocidad máxima de crecimiento * = 0.10 a 4° C y 0.33 a 8° C (log₁₀ ufc/g por día)

Concentración final:

$$0 + (18 - 0.4) \times 0.33 = 5.8 \log_{10} \text{ ufc/g, es decir, } 6.4 \times 10^5 \text{ ufc/g}$$

(*) máximo o mínimo = en este caso, muy baja probabilidad (< 5%) de superar este valor

En esta situación, el enfoque de caso único muestra que el límite de 100 ufc/g se excederá con mucho al final de la vida útil. Es necesario emplear un enfoque basado en el riesgo para tener en cuenta la variabilidad inherente al producto y evaluar la probabilidad de exceder el límite.

Planteamiento basado en el riesgo

Unidades de venta = 200 g

La contaminación inicial se evalúa en base al histórico de análisis microbiológicos: 2% de resultados positivos en muestras de 25 g. Si asumimos una distribución homogénea de la contaminación del producto, el 27% de las unidades de venta de 200 g estarán contaminadas con al menos 1 ufc/g en cada unidad.

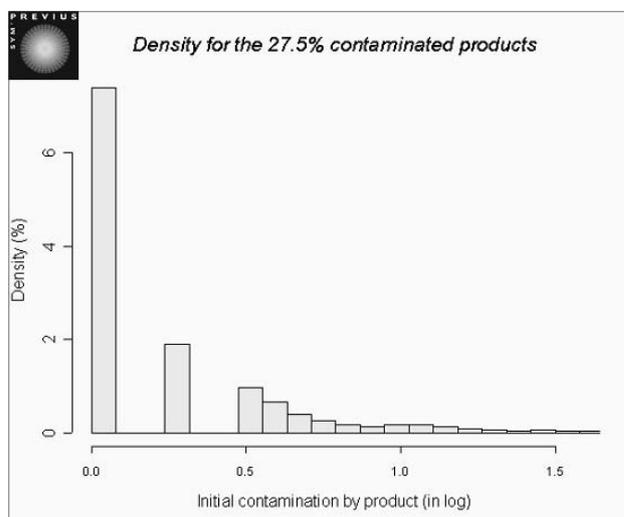


Figura 2. Evaluación de la distribución de la contaminación inicial de los productos alimenticios

Se incluyen las velocidades máximas de crecimiento (en el 95% de los casos):

- A 4° C, entre 0 y 0.10 log₁₀ ufc/g por día, con una media de 0.04
- A 8° C, entre 0 y 0.33 log₁₀ ufc/g por día, con una media de 0.20

Anexo 2

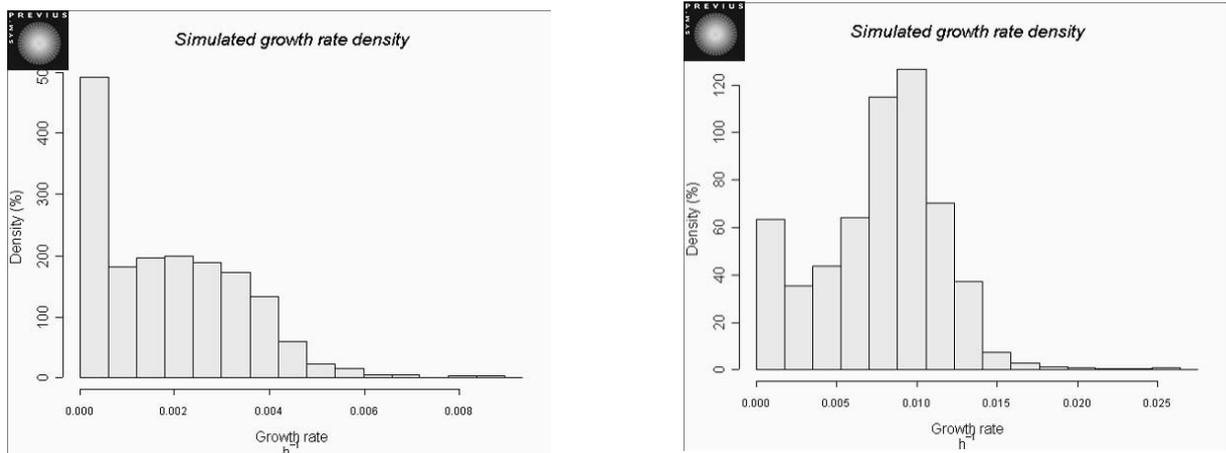


Figura 3. Variabilidad de la velocidad máxima de crecimiento (\log_{10} ufc/h) a 4° C (a la izquierda) y a 8° C (a la derecha).

El periodo de latencia está entre 11 y más de 200 días a 4° C, con una media de 45 días. El periodo de latencia residual a 8° C estará comprendido entre 0.4 y más de 1000 días, con una media de 6.6 días.

La concentración final de las unidades de 200 g contaminadas después de 10 días a 4° C seguidos de 18 días a 8° C estará comprendida entre 0.005 ufc/g y $3 \cdot 10^3$ ufc/g, con una media de 5 ufc/g.

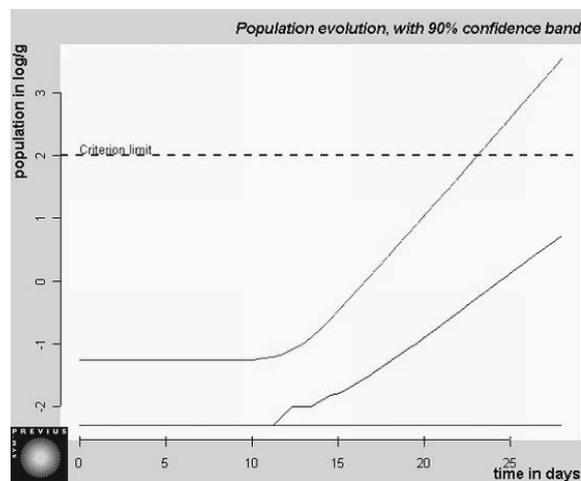


Figura 4. Simulación de crecimiento con banda de confianza (curva superior y líneas rectas inferiores) incluyendo la variabilidad inherente al microorganismo, a los factores físico-químicos y a la contaminación inicial.

Anexo 2

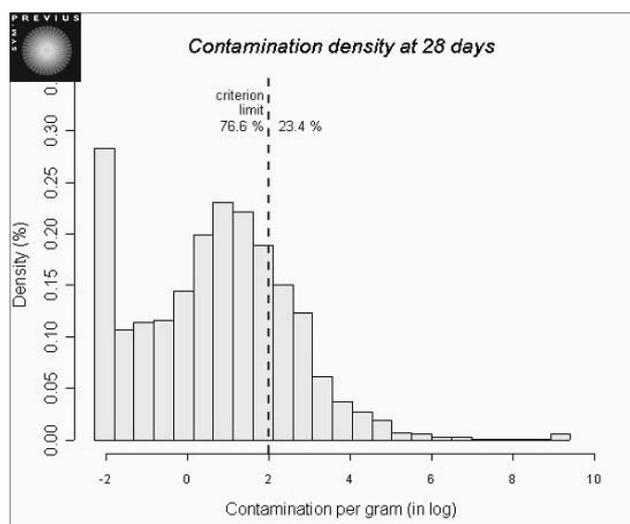


Figura 5. Distribución de la población a los 28 días, incluyendo la variabilidad inherente al microorganismo, a los factores físico-químicos y a la contaminación inicial.

Estos datos permiten calcular que el 23,4% de las unidades de 200 g contaminadas superarán el límite de 100 ufc/g, es decir, el 6,4% del total de unidades fabricadas.

Anexo 2

Ejemplo 3. Vida útil de 21 días, con 7 días a 4° C y 14 días a 8° C

Planteamiento de caso único

Temperatura de conservación máxima: 7 días a 4° C seguidos de 14 días a 8° C.

- A 4° C:
 - o Velocidad máxima de crecimiento * = 0.10 log₁₀ por día
 - o Periodo de latencia mínimo* = 11 días
- A 8° C:
 - o Velocidad máxima de crecimiento * = 0.33 log₁₀ por día
 - o Periodo de latencia mínimo* = 1.4 días

Concentración final:

$$0 + (14 - 1.4) \times 0.33 = 4.2 \log_{10} \text{ ufc/g, es decir, } 1.6 \times 10^4 \text{ ufc/g}$$

(*) máximo o mínimo = en este caso, muy baja probabilidad (< 5%) de superar este valor

Planteamiento basado en el riesgo

La contaminación inicial se evalúa a partir del histórico de datos de los análisis microbiológicos: 2% de resultados positivos en muestras de 25 g. Solo el 27.5% de las unidades de venta de 200 g estarán contaminadas con una media de 1 ufc/g.

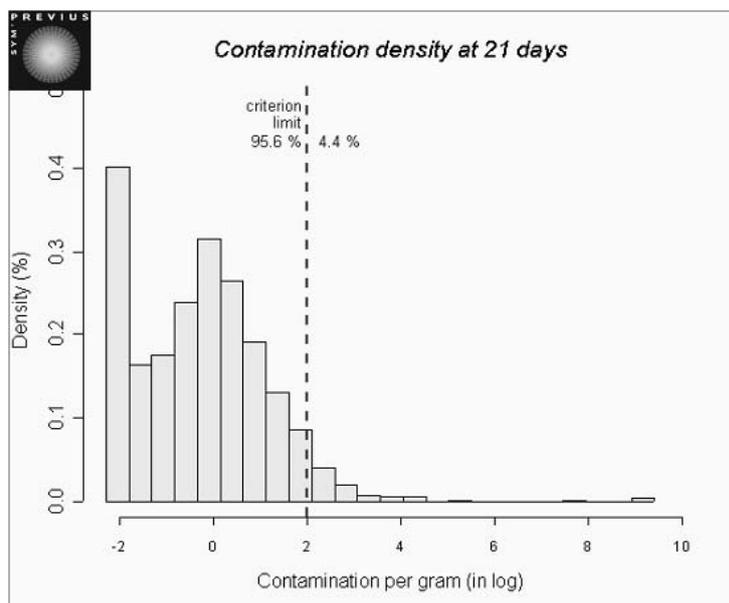


Figura 6. Distribución de la población a los 21 días, incluyendo variabilidad inherente al microorganismo, a los factores físico-químicos y a la contaminación inicial.

La aplicación de un enfoque basado en el riesgo permite calcular que el 4.4% de las unidades de 200 g contaminadas superarán el límite de 100 ufc/g, es decir, el 1,2% de todas las unidades elaboradas.

Anexo 3. Ejemplo del uso de microbiología predictiva

A partir de los parámetros de crecimiento de *L. monocytogenes* observados en un alimento a una temperatura de conservación dada, se pueden predecir los parámetros de crecimiento a otras temperaturas de conservación.

Por ejemplo, a partir de una velocidad máxima de crecimiento de $0.17 \log_{10}$ ufc/g por día y un periodo de latencia de 3.1 días obtenidos en un alimento a 8°C , podemos predecir los parámetros de crecimiento en el mismo alimento a temperaturas de 4°C , 6°C y 10°C :

- A 4°C , la velocidad máxima de crecimiento será de $0.06 \log_{10}$ ufc/g por día y el periodo de latencia será de 8.8 días.
- A 6°C , la velocidad máxima de crecimiento será de $0.11 \log_{10}$ ufc/g por día y el periodo de latencia será de 48 días.
- A 10°C , la velocidad máxima de crecimiento será de $0.25 \log_{10}$ ufc/g por día y el periodo de latencia será de 2.1 días.

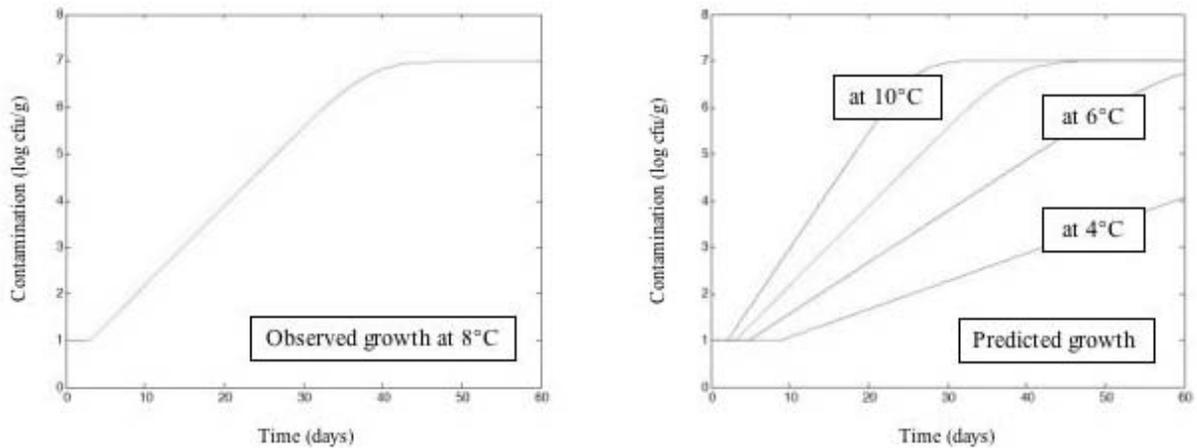


Figura 7. Ejemplo de microbiología predictiva

Anexo 4. Protocolo de estudios de durabilidad

1) Muestreo

El procedimiento de muestreo, bajo la responsabilidad de la empresa y en colaboración con el laboratorio que realizará la prueba, debe ser representativo de la población (para tener en cuenta la diversidad de la población) y debe tener una buena precisión, la cual dependerá del tamaño de la sub-población muestreada. El capítulo 3.1 del Anexo I del Reglamento 2073/2005 se refiere a los estándares ISO y Guías del *Codex Alimentarius* relevantes (2004) como métodos de referencia, en ausencia de normas más específicas sobre muestreo y preparación de las muestras.

Cuando no se disponga de información sobre la estructura de la población, la forma más objetiva de seleccionar las unidades a analizar es dar a todas las unidades de la población la misma oportunidad de ser elegidas, por lo que se recomienda el **muestreo aleatorio simple** para estimar la proporción de unidades por encima del límite de 100 ufc/g. Este método está basado en el principio de la misma probabilidad. Este principio garantiza que cada unidad de la población tiene las mismas oportunidades de ser elegida. Para satisfacer este principio, se asume que el tamaño del lote (N) debe ser lo suficientemente grande en comparación con el tamaño de la subpoblación muestreada (n): $n/N < 10\%$. Una forma de lograr el muestreo aleatorio simple es numerar las unidades o el tiempo en que se producen, y entonces usar números aleatorios para seleccionar la subpoblación a muestrear; p.e. se pueden obtener números aleatorios con un Libro de cálculo Excel y la fórmula matemática =ALEATORIO(). Este método de muestreo debería repetirse para diferentes lotes o días de producción (mismo producto, elaborado en condiciones similares) para obtener datos representativos.

| 1 | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N |
|----|-----------------|--------------------|---|---|-----------------|--------------------|------|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | Secuencia (min) | Números aleatorios | | | Secuencia (min) | Números aleatorios | | | | | | | | |
| 3 | 0 | 0.794906986 | | | 120 | 0.003588598 | | | | | | | | |
| 4 | 5 | 0.645784585 | | | 50 | 0.013601726 | | | | | | | | |
| 5 | 10 | 0.656818771 | | | 65 | 0.062019673 | | | | | | | | |
| 6 | 15 | 0.687480458 | | | 85 | 0.063602709 | | | | | | | | |
| 7 | 20 | 0.216109446 | | | 45 | 0.150601224 | | | | | | | | |
| 8 | 25 | 0.916029238 | | | 20 | 0.216109446 | | | | | | | | |
| 9 | 30 | 0.865152538 | | | 35 | 0.236245046 | | | | | | | | |
| 10 | 35 | 0.236245046 | | | 40 | 0.264314978 | | | | | | | | |
| 11 | 40 | 0.264314978 | | | 60 | 0.266345684 | | | | | | | | |
| 12 | 45 | 0.150601224 | | | 95 | 0.285580545 | n=10 | | | | | | | |
| 13 | 50 | 0.013601726 | | | 90 | 0.295170393 | | | | | | | | |
| 14 | 55 | 0.490491758 | | | 115 | 0.328738489 | | | | | | | | |
| 15 | 60 | 0.266345684 | | | 105 | 0.328771115 | | | | | | | | |
| 16 | 65 | 0.062019673 | | | 70 | 0.334386325 | | | | | | | | |
| 17 | 70 | 0.334386325 | | | 80 | 0.385249527 | | | | | | | | |
| 18 | 75 | 0.414018233 | | | 135 | 0.387208824 | | | | | | | | |
| 19 | 80 | 0.385249527 | | | 75 | 0.414018233 | | | | | | | | |
| 20 | 85 | 0.063602709 | | | 55 | 0.490491758 | | | | | | | | |
| 21 | 90 | 0.295170393 | | | 5 | 0.645784585 | | | | | | | | |
| 22 | 95 | 0.285580545 | | | 150 | 0.651923377 | n=20 | | | | | | | |
| 23 | 100 | 0.783902987 | | | 10 | 0.656818771 | | | | | | | | |
| 24 | 105 | 0.328771115 | | | 15 | 0.687480458 | | | | | | | | |
| 25 | 110 | 0.852191875 | | | 125 | 0.714912002 | | | | | | | | |
| 26 | 115 | 0.328738489 | | | 145 | 0.77206704 | | | | | | | | |
| 27 | 120 | 0.003588598 | | | 100 | 0.783902987 | | | | | | | | |
| 28 | 125 | 0.714912002 | | | 0 | 0.794906986 | | | | | | | | |
| 29 | 130 | 0.990564648 | | | 110 | 0.852191875 | | | | | | | | |
| 30 | 135 | 0.387208824 | | | 30 | 0.865152538 | | | | | | | | |
| 31 | 140 | 0.989365375 | | | 25 | 0.916029238 | | | | | | | | |
| 32 | 145 | 0.77206704 | | | 140 | 0.989365375 | | | | | | | | |
| 33 | 150 | 0.651923377 | | | 130 | 0.990564648 | | | | | | | | |

Figura 8. Ejemplo de un muestreo aleatorio a partir de un libro de cálculo Excel

Anexo 4

2) Condiciones de conservación

Las condiciones de conservación (incubación) deben cumplir con las condiciones más probables a las que está sometido el alimento en condiciones normales de uso, hasta su consumo final. **Se debe incluir el rango de temperatura típico al que se transporta, distribuye y almacena. Se trata de una parte crítica de cualquier estudio de durabilidad.** Es responsabilidad de la empresa y del laboratorio trabajar juntos para asegurar que las condiciones de conservación (incubación) utilizadas son realistas, comprendiendo el hecho de que las temperaturas adecuadas no se mantienen siempre a lo largo de toda la cadena del frío (desde la producción hasta el consumo).

La temperatura y duración se deben seleccionar dependiendo de la información disponible, según la siguiente tabla:

Tabla 3. Temperatura y duración según la etapa de la cadena alimentaria

| Etapa de la cadena | T° de incubación | | | Duración de incubación | | | |
|---|--|-------------------|-------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|------------------------|
| | | | | | | Vida útil ≤ 21 días | Vida útil > 21 días |
| Desde la fábrica hasta la llegada al expositor de venta | Justificada por información detallada* | Ó si no se conoce | 8° C | Justificada por información detallada | Ó si no se conoce | 1/3 de la vida útil total | 7 días |
| Minorista: expositor de venta | Justificada por información detallada* | Ó si no se conoce | 12° C | Justificada por información detallada | Ó si no se conoce | 1/3 de la vida útil total | ½ (vida útil - 7 días) |
| Conservación por el consumidor | Justificada por información detallada* | Ó si no se conoce | 12° C | Justificada por información detallada | Ó si no se conoce | 1/3 de la vida útil total | ½ (vida útil - 7 días) |

(*) Temperatura justificada por información detallada: el percentil 75 de las observaciones del país donde se localiza la etapa de la cadena del frío en consideración.

3) Análisis microbiológico

Al final del periodo de almacenamiento, se analizarán todas las unidades con el **método de recuento** con el fin de cuantificar si se excede o no el nivel de 100 *Listeria monocytogenes*/g. De acuerdo con el Anexo I del Reglamento 2073/2005, el método de referencia es la norma **EN ISO 11290-2**, modificada. Según el artículo 5 del mismo reglamento, se acepta el uso de métodos alternativos cuando esté validados con respecto al de referencia, y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos internacionalmente aceptados. Los métodos distintos a los descritos deberán validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente.

El límite del recuento deberá ser de 10 ufc/g, con el fin de ser capaz de cuantificar con precisión el nivel de contaminación por *L. monocytogenes* al final de periodo de conservación.

Anexo 4

4) Cálculos

En la práctica de un control rutinario (p.e. aceptación de un lote), el criterio definido en el Reglamento N° 2073/2005 es "n=5, c=0; m=M= 100 ufc/g en el momento del consumo". No obstante, estos controles no entran en el alcance de esta Guía.

La interpretación de los estudios de durabilidad, los cuales consisten en validar que el límite de 100 ufc/g no se excede en el momento del consumo, es un caso diferente. Como se describe abajo, se sugiere que esta interpretación puede facilitarse mediante la comprobación de la proporción (la cual está asociada a un intervalo de confianza) de las unidades que excederán las 100 ufc/g al final de la vida útil, después de un periodo de conservación que refleje las condiciones previsibles de distribución y almacenamiento.

De la subpoblación muestreada (de un tamaño n) tomada de forma aleatoria de un lote (de tamaño N), hay que deducir simplemente la proporción estimada de unidades que superarán las 100 ufc/g al final de la vida útil como la proporción observada $p = r/n$ (donde r es el número de unidades por encima de 100 ufc/g, y n es el tamaño de la subpoblación muestreada).

Para calcular el intervalo de confianza asociado a la proporción estimada, se usa una calculadora. En Internet existen numerosas calculadoras de acceso libre, p.e. [CausasCientia](#). Esta calculadora propone dos métodos de cálculo, el intervalo de confianza central o el intervalo de confianza más corto. Los intervalos de confianza obtenidos por cada método puede diferir ligeramente, pero son del una magnitud del mismo orden.

En la subpoblación muestreada, después del periodo de almacenamiento, la tabla 4 indica las proporciones estimadas (p) con sus intervalos de confianza para tres valores r (número de unidades > 100 L. monocytogenes/g); esta tabla destaca la importancia real de tomar de la línea de producción un número suficiente de unidades y/o recopilar los resultados previamente obtenidos, para estimar la proporción de unidades superiores a 100 ufc/g con un intervalo de confianza reducido:

Tabla 4. Ejemplo de estimación de la proporción de unidades > 100 ufc/g después del periodo de almacenamiento.

| n Número de unidades analizadas | r Número de unidades > 100 ufc/g | p Proporción estimada | IC Intervalo de confianza al 95% |
|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| 20 100 | 0 | 0% 0% | [0%- 16%] [0%- 4%] |
| 20 100 | 1 | 5% 1% | [1%- 24%] [0.2%- 5%] |
| 20 100 | 2 | 10% 2% | [3%- 30%] [0.6%- 7%] |

Cuántas más unidades se analicen, más estrecho será el intervalo de confianza; p.e., de esta tabla se puede concluir que el límite mayor del intervalo de confianza para "2 de 100 unidades que superen las 100 ufc/g" es más bajo que el obtenido para "0 de 20 unidades que superen las 100 ufc/g". Para conseguir un número mayor de unidades analizadas, es posible recopilar resultados de pruebas repetidas, realizadas en un alimento listo para el consumo obtenido mediante el mismo proceso

5) Informe del estudio

Deberá incluir al menos la siguiente información:

- Número de informe
- Identificación completa del alimento:
 - Identificación de lotes analizados y fecha de fabricación
 - Características del alimento (pH, a_w , microflora asociada,...)
 - Vida útil prevista para el alimento
- Justificación de las condiciones de conservación (tiempo y temperatura)
- Prueba de durabilidad:
 - Número de lotes por producto
 - Número de unidades analizadas
 - Días de muestreo
 - Fecha de almacenamiento (comienzo)
 - Condiciones de conservación (tiempo-temperatura) de las unidades analizadas
 - Método microbiológico de recuento y límite del mismo
 - Proporción estimada de unidades por encima del límite de 100 ufc/g al final del estudio de durabilidad con su intervalo de confianza asociado.

Anexo 5. Protocolo de los ensayos de desafío para el potencial de crecimiento

1) Características del alimento

Se deben describir y ser **representativas de la variabilidad del producto**. Se deben incluir propiedades intrínsecas y extrínsecas:

- Características físico-químicas como pH, a_w , contenido en sal, concentración de aditivos conservantes, etc.
- Microflora asociada (recuento total) o microflora específica (p.e. bacterias ácido-lácticas, Pseudomonas...)
- Condiciones del envasado (aire, vacío, atmósfera modificada)

2) Número de lotes

Se deben probar **al menos tres lotes** de un mismo producto

3) Elección de la cepa a inocular

Hay que utilizar una mezcla de **al menos tres cepas** para tener en cuenta la variabilidad de crecimiento de las mismas. Entre las cepas seleccionadas, una debe ser una cepa de referencia (ATCC, NCTC, CIP, CECT o equivalente), y las otras dos cepas deben haber sido aisladas del mismo alimento o de uno similar.

4) Preparación del inóculo

Hay que realizar **ensayos previos** para determinar el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria.

Primero, se subcultiva cada cepa en un medio (p.e. Caldo de soja y triptona (TSB) o infusión de corazón y cerebro (BHI) a una temperatura (37^a C) favorable para el crecimiento óptimo de *L. monocytogenes*, durante el tiempo suficiente para que el organismo alcance el comienzo de la fase estacionaria; este primer subcultivo tiene por objeto conseguir que todas las células alcancen el mismo estado fisiológico.

Después se prepara un segundo subcultivo y se incuba a una temperatura cercana a la de conservación del producto con el fin de que la cepa se adapte a estas condiciones de conservación; la incubación se lleva a cabo durante el tiempo suficiente para permitir el crecimiento de las cepas hasta la fase exponencial tardía o fase estacionaria temprana. Se combinan cantidades iguales de cultivos de cada una de las 3 cepas a la misma concentración. Se prepararan diluciones sucesivas del cultivo mezclado en suero fisiológico, para obtener una concentración en el alimento similar a la que sería realista esperar de forma natural.

Finalmente, **se comprueba el nivel del inóculo** en agar de soja y triptona (TSA)

Anexo 5

5) Preparación e inoculación de las unidades de prueba

Se debe preparar al menos el **número de unidades** recogido en la tabla 5. Aunque sólo se consideran el "día 0" y el "día final", es muy recomendable añadir puntos de análisis intermedios.

Tabla 5. Número de unidades a preparar

| Determinación | Día cero (inmediatamente después de la inoculación) | |
|--|--|-------|
| | Día final (fin de vida útil) | |
| Concentración de L. monocytogenes | 3 | 3 |
| Detección y/o recuento de L. monocytogenes en unidades NO inoculadas (opcional) | 3 | 3 |
| Características físico-químicas | 3 (*) | 3 (*) |
| Concentración de microflora | 3 | 3 |

(*) solo 1 si la empresa puede demostrar que el producto es homogéneo

6) Preparación de unidades no inoculadas

Se pueden analizar unidades para detectar y/o enumerar L. monocytogenes presente de forma natural en el alimento: estas "**muestras blancas**" no se inoculan. Los resultados del ensayo de desafío siguen siendo válidos, incluso si existe L. monocytogenes en las muestras blancas. Aportan información adicional sobre la ocurrencia natural de cepas a niveles realistas, al margen de la mezcla de cepas inoculada.

Para determinar las características físico-químicas y la concentración de microflora, hay que **inocular** las unidades a analizar con **suero** estéril fisiológico en lugar de con L. monocytogenes.

La determinación de las características físico-químicas y la microflora asociada son necesarias para comparar los productos sometidos al ensayo de desafío con los alimentos producidos rutinariamente en la empresa. Aún más, la determinación de la concentración de la microflora asociada puede aportar alguna información sobre posibles interacciones con L. monocytogenes, que pueden influir en su crecimiento.

7) Preparación e inoculación de las unidades de análisis para determinar la concentración de L. monocytogenes

a) Alimento. La prueba puede realizarse sobre una parte o en toda la unidad comercial del alimento. Si el alimento consta de varias partes, se debe contaminar artificialmente aquella que sea más probable de contaminarse con Listeria (p.e. el relleno de un sándwich). La distribución del inóculo debe imitar la posible distribución de Listeria en el alimento, que puede o no ser uniforme.

b) Procedimiento de inoculación. La inoculación debe ser tan efectiva como sea posible, simulando las condiciones de la contaminación natural y manteniendo las propiedades intrínsecas del alimento. Para minimizar los cambios en las propiedades físico-químicas, el inóculo no debe exceder el 1% del volumen de la unidad a analizar, ya que en caso contrario, puede afectar gravemente a las propiedades intrínsecas del alimento y, por tanto, a las características de crecimiento del inóculo.

Anexo 5

Hay que asegurarse de que el método de inoculación no cambie la composición gaseosa dentro del envase, y que la composición de gases dentro del envase inoculado sea idéntica a la de un envase no inoculado.

Se inocula el alimento o la parte específica sospechosa de estar contaminada, de forma que se imite tanto como sea posible la contaminación natural esperada:

- en profundidad: para alimentos considerados homogéneos (p.e. alimentos picados) o preparados a base de mezcla de varios ingredientes (p.e. ensaladas mixtas).
- en superficie: para imitar la contaminación de una parte específica durante el procesado (p.e. salmón ahumado contaminado durante el loncheado)

c) Nivel de contaminación. El nivel de contaminación diana es de 50 ufc/g, y no debe exceder las 100 ucf/g.

8) Condiciones de conservación del alimento inoculado

Las condiciones de conservación (incubación) deben cumplir con las condiciones más probables a las que está sometido el alimento en condiciones normales de uso, hasta su consumo final. **Se debe incluir el rango de temperatura típico al que se transporta, distribuye y almacena. Se trata de una parte crítica de cualquier ensayo de desafío.** Es responsabilidad de la empresa y del laboratorio trabajar juntos para asegurar que las condiciones de conservación (incubación) utilizadas sean **realistas**, comprendiendo el hecho de que las temperaturas adecuadas no se mantienen siempre a lo largo de toda la cadena del frío (desde la producción hasta el consumo). En consecuencia, los ensayos de desafío **deben considerar el empleo de abusos de temperatura.**

La temperatura y la duración se deben seleccionar dependiendo de la información disponible, según la siguiente tabla:

Tabla 6. Temperatura y duración según la etapa de la cadena alimentaria

| Etapa de la cadena | T° de incubación | | | Duración de incubación | | | |
|---|--|-------------------|-------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------------|
| | | | | | | Vida útil ≤ 21 días | Vida útil > 21 días |
| Desde la fábrica hasta la llegada al expositor de venta | Justificada por información detallada* | Ó si no se conoce | 8° C | | | Justificada por información detallada | Ó si no se conoce |
| Minorista: expositor de venta | Justificada por información detallada* | Ó si no se conoce | 12° C | Justificada por información detallada | Ó si no se conoce | 1/3 de la vida útil total | ½ (vida útil - 7 días) |
| Conservación por el consumidor | Justificada por información detallada* | Ó si no se conoce | 12° C | Justificada por información detallada | Ó si no se conoce | 1/3 de la vida útil total | ½ (vida útil - 7 días) |

(*) Temperatura justificada por información detallada: el percentil 75 de las observaciones del país donde se localiza la etapa de la cadena del frío en consideración.

9) Medición de características físico- químicas

Las características físico-químicas se miden de acuerdo con métodos estándar (al menos: pH; (contenido en sal; humedad); a_w)

10) Métodos analíticos:

a) Detección de *L. monocytogenes*. El método de referencia es la norma **EN ISO 11290-1**, de acuerdo con el Reglamento 2073/2005. Según el artículo 5, se acepta el uso de métodos alternativos cuando esté validados con respecto al de referencia, y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos internacionalmente aceptados. Los métodos distintos a los descritos deberán validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente.

b) Recuento de *L. monocytogenes*. El método de referencia es la norma **EN ISO 11290-2**, de acuerdo con el Reglamento 2073/2005. Según el artículo 5, se acepta el uso de métodos alternativos cuando esté validados con respecto al de referencia, y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos internacionalmente aceptados. Los métodos distintos a los descritos deberán validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente.

Puesto que el nivel diana de contaminación es de 50 ufc/g, el límite del recuento debe ser bajo, no mayor de 10 ufc/g, es decir, de acuerdo con la norma EN/ISO 11290-2, usando 1 ml de la suspensión inicial sembrado en 3 placas de 90 mm de Ø; ó sembrando 1 plato grande de 140 mm de Ø, ó, si está validado, volcándolo en 1 plato de 90 mm de Ø.

Para conseguir una menor incertidumbre, es muy recomendable elegir un método cuyo límite permita recuentos aún menores, p.e. de 5 ufc/g, es decir, con 2 ml de la suspensión inicial sembrados en 6 platos de 90 mm de Ø, ó sembrado 2 platos grandes de 140 mm de Ø, ó si está validado, volcándolo en 2 platos de 90 mm de Ø. Probablemente, el "día 0" no es necesario emplatarse 1 ml de la dilución 10^{-2} (ó 0,1 ml de la suspensión inicial).

También se puede lograr un límite bajo de recuento usando filtración u otro método que esté validado.

Según la norma EN/ISO 7218:2007, los resultados basados en el recuento de 4 colonias o menos se expresan cuantitativamente (p.e. el resultado asociado al recuento de 3 colonias tras emplatarse 2 ml de la suspensión inicial sería "1,5 ufc/g"), aunque éstos no serán frecuentes en el "día 0" (dado un nivel de contaminación diana de 50 ufc/g y un límite de recuento inferior a 10 ufc/g).

Por las mismas razones, los resultados por debajo del umbral (0 colonias contadas) deberían ser raros en el "día 0". Si son una mayoría (p.e. 2 ó 3 resultados de 3), el ensayo (para ese lote) no es aceptable.

Anexo 5

Una vez el lote ha sido inoculado y se ha practicado el recuento en el "día 0", se recomienda calcular inmediatamente la desviación estándar entre los tres log-resultados del "día 0" (o entre 2 log-resultados si uno de ellos es inferior al límite). Si esta desviación estándar (debido a la incertidumbre la medición y la contaminación heterogénea) es igual o mayor que 0.3 log ufc/g, el ensayo de desafío no es aceptable.

Cuando un ensayo de desafío no es aceptable, hay que repetir de nuevo el experimento para ese lote (o para uno similar), prestando gran atención a la homogeneidad de la contaminación y a la precisión del método de recuento (aumentar el número de placas si es necesario).

c) **Microflora asociada.** Se puede tratar de aerobios mesófilos, o una microflora específica del alimento (p.e. bacterias ácido-lácticas, Pseudomonas). Los métodos para su recuento deben seguir los correspondientes estándares CEN, ISO o nacionales, para el microorganismo y alimento implicados.

11) Cálculo del potencial de crecimiento:

El potencial de crecimiento (δ) es la diferencia entre el \log_{10} ufc/g después del crecimiento y el \log_{10} ufc/g de la concentración inicial.

Para cada lote, se calcula la diferencia entre la mediana del \log_{10} de la concentración del "día final" y la mediana del \log_{10} de la concentración del "día 0" (\log_{10} ufc/g). La mediana es el resultado intermedio de los tres. Si uno de los tres resultados se expresa como "< límite de recuento", esto no impide el cálculo de la mediana, que será el menor valor de los otros dos resultados.

Por último, se elige como δ la diferencia máxima entre el "día final" y el "día 0" entre los tres lotes.

12) Interpretación de resultados

El potencial de crecimiento indica la capacidad del alimento para soportar el crecimiento de L. monocytogenes:

- Si δ es igual o menor que $0.5 \log_{10}$, se asumen que **el alimento no puede favorecer el crecimiento de L. monocytogenes.**
- Si δ es mayor que $0.5 \log_{10}$, se asumen que **el alimento sí puede favorecer** el crecimiento de L. monocytogenes.

En los casos en que se asumen que el alimento sí puede favorecer el crecimiento de L. monocytogenes (δ mayor que $0.5 \log_{10}$), el potencial de crecimiento puede utilizarse para predicciones de crecimiento, por ejemplo:

- concentración final = concentración inicial + δ (la concentración final obtenida mediante este cálculo puede usarse para determinar, para un producto dado, con una concentración conocida en el "día 0" si la concentración prevista para el "día final" excederá el límite de 100 ufc/g)
- concentración inicial = concentración final - δ (la concentración inicial obtenida mediante este cálculo puede usarse para determinar un límite al final de la producción, lo suficientemente bajo como para garantizar que no se superará el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil).

13) Informe de la prueba

Deberá incluir al menos la siguiente información:

- Número de informe
- Identificación completa del alimento:
 - Identificación de lotes analizados y fecha de fabricación
 - Características del alimento (pH, a_w , microflora asociada,...)
 - Vida útil prevista para el alimento
- Justificación de las condiciones de conservación (tiempo y temperatura)
- Cepas consideradas:
 - Origen de las cepas
 - Condiciones de preparación del inóculo
 - Concentración del inóculo
- Ensayo de desafío:
 - Número de lotes por producto
 - Número de unidades analizadas
 - Día de la inoculación
 - Masa o volumen inoculado a las unidades a analizar
 - Volumen del inóculo y método de contaminación.
 - Condiciones de conservación (tiempo/ temperatura) de las unidades a analizar.
 - Referencia a los métodos microbiológicos (recuento y detección)
 - Límite del método de recuento.
 - Características físico-químicas del alimento al principio y al final de la prueba.
 - Nivel de microflora asociada al principio y al final de la prueba.
 - Datos obtenidos y cálculos realizados.
 - Potencial de crecimiento e interpretación.

Anexo 5

EJEMPLOS DE CÁLCULO DEL POTENCIAL DE CRECIMIENTO

A continuación se muestran dos ejemplos del cálculo del potencial de crecimiento a partir de ensayos de desafío, en los cuales se asume que los resultados de los recuentos se obtienen en las siguientes condiciones:

- el "día 0" se emplatán 2 ml de la suspensión inicial (10^{-1}) (tanto sembrados en 6 placas de 90 mm de Ø, ó en 2 placas grandes de 140 mm de Ø ó vertidos en 2 placas de 90 mm de Ø), de forma que el límite del recuento es de 5 ufc/g.
- el "día final" se emplatán 2 ml de la suspensión inicial (tanto sembrados en 6 placas de 90 mm de Ø, ó en 2 placas grandes de 140 mm de Ø ó vertidos en 2 placas de 90 mm de Ø), y 0.1 ml de la suspensión inicial de 10^{-1} en una placa de 90 mm de Ø (ó 1 ml de la dilución 10^{-2} en una placa de 90 mm de Ø)

Tabla 7. Primer ejemplo de resultados obtenidos en una prueba de potencial de crecimiento.

| Lotes | Día | Concentración (ufc/g) | Concentración (\log_{10} ufc/g) Mediana en negrita | Diferencia entre la concentración mediana en el "día final" y la concentración mediana en el "día 0" (\log_{10} ufc/g) | Potencial de crecimiento (δ) = máximo de las diferencias |
|-------|-------------|-----------------------|---|---|---|
| 1 | "día 0" | 30 | 1.48 | 1.46 – 1.48 = -0.02 | 0.42 |
| | | 50 | 1.70 | | |
| | | 20 | 1.30 | | |
| | "día final" | 43 | 1.63 | | |
| | | 24 | 1.38 | | |
| | | 29 | 1.46 | | |
| 2 | "día 0" | 45 | 1.65 | 1.46 – 1.48 = -0.02 | 0.42 |
| | | 30 | 1.48 | | |
| | | 30 | 1.48 | | |
| | "día final" | 29 | 1.46 | | |
| | | 43 | 1.63 | | |
| | | 14 | 1.15 | | |
| 3 | "día 0" | < 5 | < 0.70 | 1.72 – 1.30 = 0.42 | 0.42 |
| | | 25 | 1.40 | | |
| | | 20 | 1.30 | | |
| | "día final" | 52 | 1.72 | | |
| | | 38 | 1.58 | | |
| | | 81 | 1.91 | | |

En este primer ejemplo, las desviaciones estándar para los 3 resultados del "día 0" son 0.20 \log_{10} ufc/g para el lote 1; 0.10 \log_{10} ufc/g para el lote 2, y 0.07 \log_{10} ufc/g para el lote 3, sin tener en cuenta el resultado por debajo del límite del recuento. Por lo tanto, pueden usarse todos los resultados. La diferencia máxima entre la concentración mediana en el "día final" y la concentración mediana en el "día 0" (\log_{10} ufc/g) para cada lote es $\delta = 0.42$ (\log_{10} ufc/g).

Anexo 5

Tabla 8. Segundo ejemplo de resultados obtenidos en una prueba de potencial de crecimiento.

| Lotes | Día | Concentración (ufc/g) | Concentración (log ₁₀ ufc/g) Mediana en negrita | Diferencia entre la concentración mediana en el "día final" y la concentración mediana en el "día 0" (log ₁₀ ufc/g) | Potencial de crecimiento (δ) = máximo de las diferencias |
|-------|-------------|-----------------------|--|--|---|
| 1 | "día 0" | 25 | 1.40 | 2.28 – 1.40 = 0.88 | 0.88 |
| | | 20 | 1.30 | | |
| | | 55 | 1.74 | | |
| | "día final" | 100 | 2.00 | | |
| | | 210 | 2.33 | | |
| | | 190 | 2.28 | | |
| 2 | "día 0" | 60 | 1.78 | 2.54 – 1.70 = 0.84 | 0.88 |
| | | 30 | 1.48 | | |
| | | 50 | 1.70 | | |
| | "día final" | 250 | 2.40 | | |
| | | 350 | 2.54 | | |
| | | 390 | 2.59 | | |
| 3 | "día 0" | 20 | 1.30 | 1.72 – 1.30 = 0.42 | |
| | | 25 | 1.40 | | |
| | | 20 | 1.30 | | |
| | "día final" | 43 | 1.63 | | |
| | | 52 | 1.72 | | |
| | | 76 | 1.88 | | |

En este segundo ejemplo, las desviaciones estándar para los 3 resultados del "día 0" son 0.23 log₁₀ ufc/g para el lote 1; 0.16 log₁₀ ufc/g para el lote 2, y 0.06 log₁₀ ufc/g para el lote 3. Por lo tanto, pueden usarse todos los resultados. La diferencia máxima entre la concentración mediana en el "día final" y la concentración mediana en el "día 0" (log₁₀ ufc/g) para cada lote es $\delta = 0.88$ (log₁₀ ufc/g).

Anexo 6. Protocolo de ensayos de desafío para la velocidad máxima de crecimiento

1) Características del producto

Se deben describir y ser representativas de la variabilidad del producto. Se deben incluir propiedades intrínsecas y extrínsecas:

- Características físico-químicas como pH, a_w , contenido en sal, concentración de aditivos conservantes, etc.
- Microflora asociada (recuento total) o microflora específica (p.e. bacterias ácido-lácticas, Pseudomonas...)
- Condiciones del envasado (aire, vacío, atmósfera modificada)

2) Número de lotes

Hay que probar al menos **tres lotes** de un mismo producto

3) Elección de cepa(s)

Hay que probar cada lote con **dos cepas por separado**: una cepa procedente de la misma matriz alimentaria o una similar, y una cepa de referencia (ATCC, NCTC, CIP, CECT o equivalente). Antes de realizar la inoculación, se usan curvas de crecimiento en caldo para seleccionar las dos cepas más rápidas.

4) Preparación del inóculo

En este caso, la concentración inicial de *L. monocytogenes* podría ser mayor que la concentración esperada en el alimento, que en general es baja. Antes de realizar el ensayo de desafío, hay que realizar **ensayos previos** para determinar el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria.

Primero se subcultiva la cepa en un medio (p.e. Caldo de soja tripotona (TSB) o infusión corazón-cerebro (BHI) y a una temperatura (37° C) favorable para el crecimiento óptimo de *L. monocytogenes*, durante el tiempo suficiente para que alcance el principio de la fase estacionaria.

Después se realiza un segundo subcultivo en condiciones idénticas.

5) Preparación de las unidades de prueba

Las pruebas requieren un muestreo destructivo. Se deben preparar al menos el **número de unidades** recogido en la siguiente tabla:

Tabla 9. Número de unidades a preparar por cada curva

| Determinación | Unidades a analizar |
|---|---------------------|
| Determinación de μ_{max} (curva de crecimiento) | 10 a 15 |
| Detección de <i>L. monocytogenes</i> en el alimento antes del ensayo de desafío ("día 0") y recuento al final ("día final") | 3 + 3 |
| Determinación de características físico-químicas al inicio ("día 0") y al final ("día final") | 3* + 3* |
| Recuento de microflora asociada o específica | 2 ó 10 ó 15 |

* una unidad es suficiente si la empresa puede demostrar que el producto es homogéneo.

Anexo 6

6) Preparación e inoculación de las unidades de prueba para determinar μ_{\max}

a) Alimento. La prueba se puede realizar sobre una parte o en toda la unidad comercial del alimento. Si el alimento consta de varias partes, se debe contaminar artificialmente aquella que sea más probable de contaminarse con Listeria (p.e. el relleno de un sándwich). La distribución del inóculo debe imitar la posible distribución de Listeria en el alimento, que puede o no ser uniforme.

b) Procedimiento de inoculación. Para cada curva, **se inoculan las unidades de prueba solo con una única cepa (no con una mezcla)**.

La inoculación debe ser tan efectiva como sea posible, simulando las condiciones de la contaminación natural y manteniendo las propiedades intrínsecas del alimento. Para minimizar los cambios en las propiedades físico-químicas, el inóculo no debe exceder el 1% del volumen de la unidad a analizar, ya que en caso contrario, puede afectar gravemente a las propiedades intrínsecas del alimento y, por tanto, a las características de crecimiento del inóculo.

Hay que asegurarse de que el método de inoculación no cambie la composición gaseosa dentro del envase, y que la composición de gases dentro del envase inoculado sea idéntica a la de un envase no inoculado.

Se inocula el alimento o la parte específica sospechosa de estar contaminada, de forma que se imite tanto como sea posible la contaminación natural esperada:

- en profundidad: para alimentos considerados homogéneos (p.e. alimentos picados) o preparados a base de mezcla de varios ingredientes (p.e. ensaladas mixtas).
- en superficie: para imitar la contaminación de una parte específica durante el procesado (p.e. salmón ahumado contaminado durante el loncheado)

c) Nivel de contaminación. El nivel de contaminación diana debería ser de unas 100 ufc/g.

7) Detección de *L. monocytogenes* en el alimento antes del ensayo de desafío (“día 0”) y recuento al final (“día final”)

Se preparan **6 unidades** de prueba para verificar la ausencia de *L. monocytogenes* en el alimento, las así llamadas “muestras blancas” no son inoculadas.

Si *L. monocytogenes* se detecta en las “muestras blancas” en el “día 0”, el ensayo de desafío no sería válido, ya que no se conocerían los números exactos al principio y no se podría calcular una velocidad de crecimiento correcta. Los recuentos resultantes en las “muestras blancas” en el “día final” tienen que ser interpretados por el laboratorio.

Anexo 6

8) Determinación de las características físico-química iniciales (“día 0”) y finales (“día final”)

Se preparan **6 unidades** de prueba para determinar las características físico-químicas: estas no se inoculan con *L. monocytogenes*, si no que en su lugar se les inyecta una solución salina fisiológica estéril.

Las características físico-químicas se miden de acuerdo con métodos estándar (al menos: pH; (contenido en sal; humedad); a_w)

9) Recuento de la microflora asociada

Se realiza el recuento de la microflora asociada en las unidades de prueba no inoculadas, bien en el momento del muestreo ó en el “día 0” y “día final”.

La microflora asociada a tener en cuenta pueden ser aerobios mesófilos o microflora específica del alimento (p.e. bacterias ácido-lácticas, *Pseudomonas*). Para el recuento de esta flora, se usan métodos de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 2073/2005. Los métodos utilizados deben seguir las normas relevantes CEN, ISO o nacionales para el microorganismo y alimento implicados.

10) Condiciones de conservación del alimento inoculado

El ensayo de desafío se realiza en este caso a una **temperatura fija**, preferiblemente cercana a la temperatura elegida para la predicción.

11) Métodos analíticos para *L. monocytogenes*:

a) Detección. El método de referencia es la norma **EN ISO 11290-1**, de acuerdo con el Reglamento 2073/2005. Según el artículo 5, se acepta el uso de métodos alternativos cuando esté validados con respecto al de referencia, y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos internacionalmente aceptados. Los métodos distintos a los descritos deberán validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente.

b) Recuento. El método de referencia es la norma **EN ISO 11290-2**, de acuerdo con el Reglamento 2073/2005. Según el artículo 5, se acepta el uso de métodos alternativos cuando esté validados con respecto al de referencia, y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos internacionalmente aceptados. Los métodos distintos a los descritos deberán validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente.

Anexo 6

12) Cálculo de la velocidad máxima de crecimiento

Se necesitan conocimientos básicos de microbiología predictiva para interpretar los resultados, usando un acercamiento simplificado como se sugiere en los siguientes párrafos. Un mayor conocimiento es útil para emplear otros modelos.

Se calculan los resultados del recuento de acuerdo con la norma EN SIO 7218 y se transforman en el logaritmo en base 10 de ufc/g (\log_{10} ufc/g).

La velocidad de crecimiento de cada curva (es decir, todos los puntos experimentales de un único lote) se pueden estimar fácilmente mediante regresión no lineal. Para este fin pueden utilizarse programas gratuitos como [MicroFit](#), que está basado en el modelo Baranyi como modelo primario. Este programa facilita una carta con los puntos experimentales y la curva ajustada mediante regresión, usando el modelo Baranyi. También extrae los parámetros de crecimiento de la curva: N_0 (logaritmo de la concentración bacteriana inicial), N_{max} (logaritmo de la concentración bacteriana final), μ_{max} (velocidad máxima de crecimiento), t-lag (tiempo de latencia), t-d (tiempo de generación o tiempo de duplicación).

Este tiempo de generación está relacionado con la velocidad máxima de crecimiento mediante la ecuación $t-d = \ln 2 / \mu_{max}$ (donde "ln" representa el logaritmo natural).

El tiempo de latencia y el tiempo de generación están expresados en unidad de tiempo (p.e. días) y la velocidad máxima de crecimiento está expresada por lo tanto en días^{-1} . Los valores de los parámetros se presentan con su intervalo de confianza. El programa también presenta la suma residual de los cuadrados (RSS) y la raíz de la media cuadrada (RMS). RSS y RMS dan una indicación de la calidad del ajuste de la curva. Hay que escoger el valor máximo entre las 6 μ_{max} obtenidas de cada una de las 6 curvas de crecimiento para realizar los siguientes cálculos.

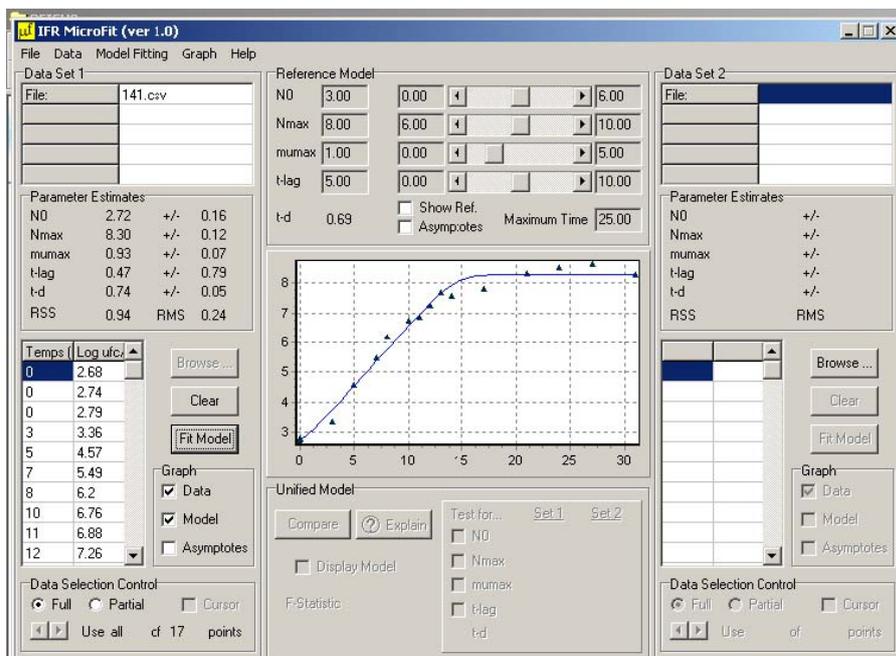


Figura 9. Uso del programa Microfit para ajustar una curva de crecimiento

13) Interpretación de resultados

Conociendo el valor de μ_{\max} a una temperatura (T_{ref}) es posible calcular otra μ_{\max} a otra temperatura (T). Por lo tanto, a partir de una curva de crecimiento a la T_{ref} , la μ_{\max} estimada usando Microfit se representa como $\mu_{\max\text{ref}}$. Después, el cálculo de la μ_{\max} en el mismo alimento (con las mismas características físico-químicas) a otra temperatura T se obtendría usando el modelo secundario de raíz cuadrada ([Ratkowsky et al., 1982](#); [Zwietering et al., 1996](#)). Si T y T_{ref} son ambas inferiores a 25° C, se sugiere utilizar la siguiente fórmula simplificada:

$$\mu_{\max} = \mu_{\max\text{ref}} \cdot \frac{(T - T_{\text{min}})^2}{(T_{\text{ref}} - T_{\text{min}})^2}$$

(con T_{min} = temperatura mínima de crecimiento de *L. monocytogenes* \approx - 2° C)

Las velocidades $\mu_{\max\text{ref}}$ y μ_{\max} pueden expresarse en \log_{10} ufc/g por día mediante la división de sus valores entre 2.3 [= ln(10)]. Pueden usarse otros modelos secundarios.

En consecuencia, asumiendo un modelo primario muy simple (sin fase de latencia ni fase estacionaria, lo cual puede conducir a resultados sin utilidad):

- El crecimiento (en \log_{10}) obtenido a la T_{ref} durante un tiempo de almacenamiento d_1 (en días) es igual a $\mu_{\max\text{ref}}$ (expresada en \log_{10} ufc/g por día) x d_1 .
- El crecimiento (en \log_{10}) obtenido a una temperatura T durante un tiempo de almacenamiento d_2 (en días) es igual a μ_{\max} (expresada en \log_{10} ufc/g por día) x d_2 .

Se pueden usar otros modelos primarios.

La predicción puede por lo tanto aplicarse a cualquier perfil tiempo-temperatura, y en particular, a las condiciones a las que el producto es más probable que esté sujeto en su uso normal hasta su consumo final.

14) Informe de la prueba

Deberá incluir al menos la siguiente información:

- Número de informe
- Identificación completa del alimento:
 - Identificación de lotes analizados y fecha de fabricación
 - Características del alimento (pH, a_w , microflora asociada,...)
- Cepas consideradas:
 - Origen de las cepas
 - Condiciones de preparación del inóculo
 - Concentración del inóculo
- Ensayo de desafío:
 - Número de lotes por alimento
 - Número de unidades de prueba analizadas
 - Día de la inoculación
 - Masa o volumen de las unidades de prueba que se inoculan
 - Volumen del inóculo y método de contaminación.
 - Condiciones de conservación (tiempo/ temperatura) de las unidades a analizar.
 - Métodos microbiológicos (recuento y detección)
 - Límite del método de recuento.
 - Características físico-químicas del alimento al principio y al final de la prueba.
 - Nivel de microflora asociada al principio y al final de la prueba.
 - Datos obtenidos y cálculos realizados.
 - Velocidad máxima de crecimiento e interpretación.

Anexo 6

EJEMPLO DEL CÁLCULO DE LA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO

Datos:

- Vida útil = 9 días
- Condiciones de conservación: 4° C durante 3 días (d₁) y 8° C durante 6 días (d₂)

El ensayo de desafío se realizó a una T_{ref} = 8° C y permitió estimar una $\mu_{\max\text{ref}} = 0.78$ ln ufc/g por día, convertida en 0.34 log₁₀ ufc/g por día.

El modelo secundario permite predecir la μ_{\max} a una T = 4° C, con su intervalo de confianza.

$$\mu_{\max} = \mu_{\max\text{ref}} \cdot \frac{(T - T_{\min})^2}{(T_{\text{ref}} - T_{\min})^2}$$

El punto estimado es:

$$\mu_{\max} = 0.78 \frac{(4 - (-2))^2}{(8 - (-2))^2} = 0.28 \text{ ln ufc/g por día, convertida en } 0.12 \text{ log}_{10} \text{ ufc/g por día}$$

En consecuencia, la velocidad de crecimiento prevista a 4° C es de 0.12 log₁₀ ufc/g por día.

- Pregunta 1: ¿cuál será el crecimiento de L. monocytogenes previsto durante la vida útil?

Crecimiento durante la vida útil =

[($\mu_{\max 1}$ en log₁₀ ufc/g por día) x d₁] + [($\mu_{\max 2}$ en log₁₀ ufc/g por día) x d₂], donde

$$\text{Crecimiento} = (0.12 \times 3) + (0.34 \times 6) = 2.40 \text{ log}_{10} \text{ ufc/g}$$

Este cálculo no incluye la fase de latencia ni la fase estacionaria (es decir, asume que todo el comportamiento simulado tiene un crecimiento exponencial) y en consecuencia, los resultados pueden ser (muy) inseguros o incluso inútiles.

- Pregunta 2: ¿cuál será la concentración al inicio de la vida útil con el fin de respetar el límite de 100 ufc/g?

Concentración inicial = Concentración final – crecimiento durante la vida útil

La concentración final es el límite de 100 ufc/g (2 log₁₀ ufc/g):

$$2 - 2.40 = -0.40 \text{ log}_{10} \text{ ufc/g} = 0.4 \text{ ufc/g}$$

- Pregunta 3: ¿cuál será la concentración de L. monocytogenes al final de la vida útil si el nivel de L. monocytogenes en el día 7 es igual a 1.65 log₁₀ ufc/g?

El nivel de L. monocytogenes en el "día final" será 1.65 + 0.34 x 2 = 3.33 log₁₀ ufc/g. El límite de 100 ufc/g se superará en este producto.

Anexo 7. Listado de verificación de directrices técnicas

ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL:

- **Alimento** (*denominación*):
- **Categoría:** 1.1 Lactantes y usos médicos 1.2. Favorecen 1.3. No favorecen
- **Procesado:** Elaboración Envasado (describir):
- **Vida útil** (*tiempo y temperatura*):

Los ítems y apartados **marcados con un asterisco** son Recomendaciones de la Comisión Europea.

| I. CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA | SÍ | NO |
|---|----|----|
| Se especifican las características físico-químicas del alimento (pH, a_w , contenido de sal, concentración de conservantes, tipo de envasado) | | |
| Se describe la microflora habitual asociada o específica* | | |
| Se analizan de acuerdo con métodos estándar (normas CEN, ISO o nacionales)* | | |
| Son representativas de la variabilidad del alimento (se analizan al menos 3 lotes, o solo 1 si se demuestra que es homogéneo*) | | |
| Se tienen en cuenta las condiciones de almacenamiento, las condiciones de transformación, las posibilidades de contaminación, y la vida útil prevista. | | |
| Las características del ALC se comparan con la bibliografía científica para determinar si es posible la supervivencia o el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos con características similares. | | |

| II. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS | SÍ | NO |
|---|----|----|
| Toman como base las características del producto y la bibliografía científica | | |
| Tienen en cuenta la variabilidad inherente al producto (lotes) | | |
| Tienen en cuenta la variabilidad inherente al microorganismo | | |
| Tienen en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de transformación, almacenamiento, distribución y utilización | | |
| A. Se aporta el histórico de datos* | | |
| B. Se realiza microbiología predictiva | | |
| C. Se realizan estudios de durabilidad | | |
| D. Se realizan ensayos de desafío para calcular el potencial de crecimiento | | |
| E. Se realizan ensayos de desafío para calcular la velocidad máxima de crecimiento | | |

| A) HISTÓRICO DE DATOS * | SÍ | NO |
|---|----|----|
| Los datos históricos se han obtenido siguiendo el plan de muestreo reglamentario | | |
| Los datos históricos se han analizado usando los métodos de referencia o alternativos | | |
| El número de análisis realizados se considera suficiente para dar fiabilidad al histórico | | |
| Los datos históricos evidencian que no se superarán las 100 ufc/g al final de la vida útil, en el caso de que <i>L. monocytogenes</i> esté presente inicialmente en el ALC: | | |
| - Los niveles de <i>L. monocytogenes</i> en los ALC al final de su vida útil son consistentemente bajos o ausentes, verificando la duración de esta vida. | | |
| - Los niveles de <i>L. monocytogenes</i> en los ALC en el día de fabricación son consistentemente bajos o ausentes, verificando la eficacia del sistema APPCC. | | |
| - Los resultados de los muestreos de superficies demuestran la eficacia del sistema de limpieza y desinfección. | | |
| - Los resultados de los controles de las materias primas demuestran su calidad. | | |

Anexo 7

| B) MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA | SÍ | NO |
|---|----|----|
| Se usa un modelo predictivo adecuado para el ALC en estudio. | | |
| Se utilizan factores críticos de crecimiento o supervivencia aplicables a los microorganismos en cuestión presentes en el producto. | | |
| Se usan modelos de "crecimiento/ no crecimiento" para categorizar los ALC.* | | |
| Se usan modelos para predecir tiempo de latencia y velocidad de crecimiento para evaluar el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> , considerando variabilidad de las cepas, del procesado, del alimento y de las condiciones de conservación.* | | |
| Los resultados evidencian que no se superarán las 100 ufc/g al final de la vida útil, en el caso de que <i>L. monocytogenes</i> esté presente inicialmente en el alimento. | | |

| C) ESTUDIOS DE DURABILIDAD | SÍ | NO |
|--|----|----|
| 1. Método de muestreo | | |
| Se realiza un muestreo aleatorio simple* | | |
| El número de unidades analizadas permite una buena precisión ($n/N < 10\%$)* | | |
| El muestreo se repite para diferentes lotes a fin de tener en cuenta su variabilidad | | |
| 2. Condiciones de conservación (incubación) del alimento | | |
| El alimento se conserva en condiciones normales de uso hasta su consumo final, incluyendo abusos de temperatura. | | |
| Se justifican las condiciones de conservación. | | |
| 3. Método analítico para recuento de <i>L. monocytogenes</i> | | |
| Se utiliza el método de referencia, o uno alternativo validado o registrado. | | |
| El límite del recuento no excede de 10 ufc/g | | |
| 4. Cálculos* | | |
| Se calcula la proporción observada ($p = r/n$) de unidades que superan las 100 ufc/g | | |
| Se calcula el intervalo de confianza asociado a esta proporción | | |
| 5. Informe del estudio * | | |
| Número de informe | | |
| Identificación completa del alimento: | | |
| - Identificación de lotes probados y fecha de fabricación | | |
| - Características (pH, a_w , microflora asociada,...) | | |
| - Vida útil prevista para el alimento | | |
| - Justificación de las condiciones de conservación (tiempo y T^a) | | |
| Estudio de durabilidad: | | |
| - Número de lotes por producto | | |
| - Número de unidades analizadas | | |
| - Días de muestreo | | |
| - Fecha de conservación (comienzo) | | |
| - Condiciones de conservación (tiempo-temperatura) de las unidades analizadas | | |
| - Método microbiológico de recuento y límite | | |
| - Proporción estimada de unidades > de 100 ufc/g e intervalo de confianza asociado. | | |

Anexo 7

| D) ENSAYOS DE DESAFÍO PARA POTENCIAL DE CRECIMIENTO | SÍ | NO |
|--|----|----|
| 1. Número mínimo de lotes probados* | | |
| Se prueban al menos tres lotes de un mismo alimento | | |
| 2. Número mínimo de unidades de prueba por lote ("día 0" + "día final")* | | |
| Concentración de <i>L. monocytogenes</i> en unidades inoculadas: 3 + 3 | | |
| Detección y/o recuento de <i>L. monocytogenes</i> en unidades NO inoculadas (<i>OPCIONAL</i>): 3 + 3 | | |
| Características físico-químicas en unidades inyectadas con suero: 3 + 3 (1 + 1 si se demuestra homogeneidad) | | |
| Recuento de microflora en unidades inyectadas con suero: 3 + 3 | | |
| 3. Preparación de unidades no inoculadas * | | |
| Se inocula suero fisiológico estéril a las unidades en las que se determinan características físico-químicas y microflora asociada. | | |
| 4. Cepas a inocular * | | |
| Se utiliza una mezcla de al menos 3 cepas: una cepa de referencia y otras dos cepas aisladas del mismo alimento o de uno similar. | | |
| 5. Preparación del inóculo* | | |
| Se realizan dos subcultivos previos de cada cepa, durante el tiempo necesario para alcanzar la fase de crecimiento estacionaria: | | |
| - Primer subcultivo en Caldo de soja y triptona (TSB) o Infusión de corazón y cerebro (BHI) a Tª de 37º C hasta el comienzo de la fase estacionaria. | | |
| - Segundo subcultivo a Tª próxima a la de conservación del alimento, hasta la fase exponencial tardía o la fase estacionaria temprana. | | |
| Se combinan cantidades iguales de cultivos de cada una de las 3 cepas a la misma concentración. | | |
| Se preparan diluciones sucesivas del cultivo en suero fisiológico para obtener una concentración similar a la natural. | | |
| Se comprueba la concentración del inóculo en agar de soja y triptona (TSA). | | |
| 6. Procedimiento de inoculación* | | |
| El inóculo no excede el 1% del volumen de la unidad de prueba. | | |
| Los gases del envase inoculado son idénticos a los de un envase no inoculado. | | |
| La distribución del inóculo (uniforme o no) imita a la esperable de forma natural. | | |
| La inoculación imita a la contaminación esperable de forma natural (todo el alimento o solo la parte sospechosa; en profundidad o en superficie). | | |
| El nivel de contaminación diana es de 50 ufc/g, y el logrado no excede de 100 ucf/g. | | |
| 7. Condiciones de conservación (incubación) del alimento inoculado | | |
| Se conserva en las condiciones más probables normales de uso a lo largo de toda su vida útil, incluyendo abusos de temperatura. | | |
| Se justifican las condiciones de conservación | | |
| 8. Métodos analíticos para <i>L. monocytogenes</i> | | |
| Detección: (<i>ANÁLISIS OPCIONAL</i>) Se utiliza el método de referencia (EN ISO 11290-1) o uno alternativo validado o registrado. | | |
| Recuento: Se utiliza el método de referencia (EN ISO 11290-2) o uno alternativo validado o registrado. | | |
| El límite del recuento no excede de 10 ufc/g . (o preferiblemente 5 ufc/g*). | | |
| El límite del recuento se logra según la metodología descrita en la guía. * | | |
| Se expresan cuantitativamente los resultados del recuento de 4 colonias o menos (p.e. 3 colonias tras emplatarse 2 ml iniciales sería "1,5 ufc/g"). * | | |
| Los resultados por debajo del umbral (0 colonias contadas) son raros en el "día 0", y si son una mayoría (p.e. 2 ó 3 resultados de 3), la prueba no se acepta. * | | |
| La desviación estándar entre los tres log-resultados del "día 0" (o entre 2 log-resultados si uno es inferior al límite) es menor que 0.3 log ufc/g. * | | |

Anexo 7

| D) ENSAYOS DE DESAFÍO PARA POTENCIAL DE CRECIMIENTO (continuación) | SÍ | NO |
|---|----|----|
| 9. Cálculo del potencial de crecimiento* | | |
| El potencial de crecimiento (δ) se define como la diferencia entre el \log_{10} ufc/g después del crecimiento y el \log_{10} ufc/g de la concentración inicial: | | |
| - Para cada uno de los tres lotes, se calcula la diferencia entre la mediana de la concentración del "día final" y la mediana de la concentración del "día 0" (expresadas en \log_{10} ufc/g). Si uno de los tres resultados es "< límite de recuento", la mediana será el menor valor de los otros dos resultados. | | |
| - Se elige como δ la diferencia máxima entre el "día final" y el "día 0" entre los tres lotes. | | |
| 10. Interpretación de resultados* | | |
| - Si $\delta \leq 0.5 \log_{10}$: el alimento no puede favorecer el crecimiento. | | |
| - Si $\delta > 0.5 \log_{10}$: el alimento sí puede favorecer el crecimiento. | | |
| El δ se usa para predicciones de crecimiento en alimentos que sí pueden favorecerlo (concentración final y/o concentración inicial) | | |
| 11. Informe de la prueba * | | |
| Número de informe | | |
| Identificación completa del alimento: | | |
| - Identificación de lotes probados y fecha de fabricación | | |
| - Características (pH, a_w , microflora asociada,...) | | |
| - Vida útil prevista para el alimento | | |
| - Justificación de las condiciones de conservación (tiempo y Tª) | | |
| Cepas inoculadas: | | |
| - Origen de las cepas | | |
| - Preparación del inóculo | | |
| - Concentración del inóculo | | |
| Ensayo de desafío: | | |
| - Número de lotes por alimento | | |
| - Número de unidades de prueba | | |
| - Día de la inoculación | | |
| - Masa o volumen de las unidades que se inoculan. | | |
| - Volumen del inóculo. | | |
| - Método de contaminación | | |
| - Condiciones de conservación (tiempo/ Tª) de las unidades inoculadas. | | |
| - Métodos microbiológicos empleados (recuento y detección) | | |
| - Límite del método de recuento. | | |
| - Características físico-químicas al principio y al final de la prueba. | | |
| - Nivel de microflora asociada al principio y al final de la prueba. | | |
| - Resultados brutos y cálculos realizados. | | |
| - Potencial de crecimiento e interpretación. | | |

Anexo 7

| E) ENSAYOS DE DESAFÍO PARA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO | | SÍ | NO |
|---|--|----|----|
| 1. Número de lotes probados* | | | |
| Se prueban al menos tres lotes de un mismo alimento | | | |
| 2. Número mínimo de unidades de prueba por lote* | | | |
| Curva de crecimiento (μ_{max}) en unidades inoculadas: de 10 a 15 | | | |
| Detección de <i>L. monocytogenes</i> el "día 0" y recuento el "día final" en unidades NO inoculadas ("muestras blancas"): 3 + 3 | | | |
| Características físico-químicas en unidades inyectadas con suero: 3 + 3 (1 + 1 si se demuestra homogeneidad) | | | |
| Recuento de microflora en unidades no inoculadas: 2 ó 10 ó 15 | | | |
| 3. Preparación y procesado de las unidades no inoculadas * | | | |
| La prueba se invalida si se detecta <i>L. monocytogenes</i> en "muestras blancas" el "día 0" | | | |
| En su caso, el laboratorio interpreta el recuento de <i>L. monocytogenes</i> obtenido en "muestras blancas" el "día final" | | | |
| Se inocula suero fisiológico estéril a las unidades en las que se determinan características físico-químicas. | | | |
| Se realiza el recuento de la microflora asociada (aerobios mesófilos o microflora específica) bien en cada punto/momento de muestreo o bien en el "día 0" y el "día final" | | | |
| 4. Cepas a inocular * | | | |
| Se utilizan 2 cepas por separado: una cepa de referencia y otra aislada del mismo alimento o de uno similar. | | | |
| 5. Preparación del inóculo * | | | |
| Se realizan dos subcultivos previos de cada cepa, durante el tiempo necesario para alcanzar la fase de crecimiento estacionaria: | | | |
| - Primer subcultivo en Caldo de soja y triptona (TSB) o Infusión de corazón y cerebro (BHI) a Tª de 37° C hasta el comienzo de la fase estacionaria. | | | |
| - Segundo subcultivo en idénticas condiciones. | | | |
| 6. Procedimiento de inoculación * | | | |
| Para cada curva, las unidades de prueba se inoculan solo con una cepa (no con una mezcla) | | | |
| El inóculo no excede el 1% del volumen de la unidad de prueba. | | | |
| Los gases del envase inoculado son idénticos a los de un envase no inoculado. | | | |
| La distribución del inóculo (uniforme o no) imita a la esperable de forma natural. | | | |
| La inoculación imita a la contaminación esperable de forma natural (todo el alimento o solo la parte sospechosa; en profundidad o en superficie). | | | |
| El nivel de contaminación diana es de 100 ufc/g aproximadamente. | | | |
| 7. Condiciones de conservación (incubación) del alimento inoculado * | | | |
| Las unidades inoculadas se incuban a una temperatura fija, cercana a la elegida para predicción | | | |
| 8. Métodos analíticos para <i>L. monocytogenes</i> | | | |
| Detección: Se utiliza el método de referencia (EN ISO 11290-1) o uno alternativo validado o registrado. | | | |
| Recuento: Se utiliza el método de referencia (EN ISO 11290-2) o uno alternativo validado o registrado. | | | |
| El límite del recuento no excede de 10 ufc/g (o preferiblemente 5 ufc/g*). | | | |
| 9. Cálculo de la velocidad de crecimiento máxima * | | | |
| Se calcula según se describe en la guía. | | | |
| 10. Interpretación de resultados | | | |
| A partir de la velocidad de crecimiento máxima a la Tª de referencia, se calculan velocidades para los perfiles tiempo/temperatura más probables para el alimento hasta su consumo final. | | | |

Anexo 7

| E) ENSAYOS DE DESAFÍO PARA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO (continuación) | SÍ | NO |
|---|----|----|
| 11. Informe de la prueba * | | |
| Número de informe | | |
| Identificación completa del alimento: | | |
| - Identificación de lotes probados y fecha de fabricación | | |
| - Características (pH, a _w , microflora asociada,...) | | |
| Cepas inoculadas: | | |
| - Origen de las cepas | | |
| - Preparación del inóculo | | |
| - Concentración del inóculo | | |
| Ensayo de desafío: | | |
| - Número de lotes por alimento | | |
| - Número de unidades de prueba analizadas | | |
| - Día de la inoculación | | |
| - Masa o volumen de las unidades que se inoculan. | | |
| - Volumen del inóculo. | | |
| - Método de contaminación | | |
| - Condiciones de conservación (tiempo/ T°) de las unidades inoculadas. | | |
| - Métodos microbiológicos empleados (recuento y detección) | | |
| - Límite del método de recuento. | | |
| - Características físico-químicas al principio y al final de la prueba. | | |
| - Nivel de microflora asociada al principio y al final de la prueba. | | |
| - Resultados brutos y cálculos realizados. | | |
| - Velocidad de crecimiento máxima e interpretación. | | |

Anexo 8. Ejemplos de características físico-químicas

Tabla 10. Valores orientativos de actividad de agua (aw) y pH para distintos alimentos

| Sector | Alimentos | aw | pH | Sector | Alimentos | aw | pH |
|------------|---------------------------------|-----------|---------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|---------|
| Carnes | Picada cruda pollo | ≥ 0,98 | 6,3-6,4 | Comidas | Bacalao hervido | | 5,3-6,1 |
| | Picada cruda vacuno | ≥ 0,98 | 5,4-5,8 | | Crema de espárragos | | 6,1 |
| | Picada cruda cerdo | ≥ 0,98 | 5,6-6,0 | | Judías blancas guisadas | | 4,8-5,5 |
| | Embutidos fermentados | | 4,7-6,2 | | Judías blancas guisadas con cerdo | | 5,1-5,8 |
| | Jamón cocido | | 6,3-6,5 | | Lenguado hervido | | 6,1-6,9 |
| | Jamón serrano, cecina | 0,85-0,93 | | | Merluza asada | | 6,7-6,8 |
| | Paté | | 5,9 | | Patatas en ensalada | | 3,9-4,6 |
| | Salchicha cocida tipo Frankfurt | | 6,2 | | Pollo guisado con tallarines | | 6,2-6,7 |
| Pescados | Arenque curado | | 5,7-6,2 | | Postre de gelatina | | 2,6 |
| | Arenque en escabeche (cocido) | | 4,0 | | Salsa de arándanos | | 2,3 |
| | Atún crudo | ≥ 0,98 | 5,9-6,1 | | Salsa de curry | | 6,0 |
| | Bacalao crudo | ≥ 0,98 | 6,0-6,1 | | Sopa de alubias | | 5,7-5,8 |
| | Caballa cruda | ≥ 0,98 | 5,9-6,2 | | Sopa de carne | | 6,0-6,2 |
| | Caviar americano | | 5,7-6,0 | | Sopa de fideos | | 5,6 |
| | Pescado ligeramente salado | 0,93-0,98 | | | Sopa de guisantes | | 5,7-6,2 |
| | Pescado muy salado | 0,60-0,85 | | | Sopa de ostras | | 6,5-6,9 |
| Crustáceos | Carne de cangrejo | | 6,5-7,0 | | Sopa de pato | | 5,0-5,7 |
| | Gambas crudas | ≥ 0,98 | 6,8-7,0 | | Sopa de pollo y fideos | | 5,5-6,5 |
| | Langosta cocida | | 7,1-7,4 | | Sopa de setas | | 6,3-6,7 |
| Moluscos | Almejas crudas | ≥ 0,98 | 5,9-7,1 | | Sopa de pollo y fideos | | 5,5-6,5 |
| | Ostras | ≥ 0,98 | 6,3-6,7 | Sopa de tomate | | 4,2-5,2 | |
| Huevos | Clara de huevo | | 9,3-9,6 | Sopa de verduras y hortalizas | | 4,7-5,6 | |
| | Mayonesa | | 3,0-4,1 | Tofu (soja) | | 7,20 | |
| Lácteos | Leche entera | ≥ 0,98 | 6,4-6,8 | Lácteos | Leche acidófila | ≥ 0,98 | 5 |
| | Leche condensada azucarada | 0,85-0,93 | | | Kefir, koumis, yakult, miru-miru | | 4,0 |
| | Queso crema | | 4,1-4,8 | | Queso tipo Camembert | | 7,4 |
| | Queso fresco (cottage) | | 4,5 | | Queso tipo Gouda | 0,93-0,98 | |
| | Quesos de maduración corta | 0,93-0,98 | | | Queso tipo Gruyere | | 5,6-6,6 |
| | Quesos muy madurados | 0,60-0,85 | | | Queso tipo Parmesano | | 5,2-5,3 |
| | Queso tipo Cheddar curado | 0,85-0,93 | 5,9 | | Queso tipo Roquefort | | 4,7-4,8 |

Anexo 8

| Sector | Alimentos | aw | pH | Sector | Alimentos | aw | pH | |
|------------------|-------------------------------|-----------|---------|--------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|---------|
| Frutas | Frutas desecadas | 0,90 | 4,5 | Hortalizas Brassica | Brécol | ≥ 0,98 | 5,2-6,0 | |
| | Frutas secas | 0,60-0,85 | | | Brócoli cocido | | 6,3-6,5 | |
| | Macedonias | ≥ 0,98 | 3,6-4,0 | | Col fermentada | | 3,1-3,7 | |
| | Mermeladas | | 3,5-4,0 | | Coliflor cocida | | 6,4-6,8 | |
| | Mermeladas y confituras | 0,60-0,85 | | | Repollo | | 5,2-6,8 | |
| | Zumos | ≥ 0,98 | 3,5-5,5 | | Calabacín | ≥ 0,98 | 5,0-5,3 | |
| Frutas cítricas | Cítricos | ≥ 0,98 | 3,0-3,5 | Hortalizas Cucurbitáceas | Calabacín cocido | | 5,7-6,1 | |
| | Limonas | ≥ 0,98 | 2,2-2,4 | | Calabaza | | 5,2-5,5 | |
| | Pomelo en trozos, pulpa, zumo | ≥ 0,98 | 2,9-3,5 | | Melón | | 6,13-6,58 | |
| | Zumo de lima | ≥ 0,98 | 2,2-2,4 | | Pepinillos en vinagre (acético) | | 4,0-7,0 | |
| | Zumo de limones | ≥ 0,98 | 2,2-2,6 | | Hortalizas de hoja | Escarola | | 5,7-6,0 |
| | Zumo de naranja | ≥ 0,98 | 3,0-4,0 | | | Espinaca | ≥ 0,98 | 4,8-5,8 |
| Frutas de hueso | Albaricoques | | 3,3-4,8 | Hortalizas Leguminosas | Espinaca cocida | | 6,6-7,1 | |
| | Ciruelas | ≥ 0,98 | 2,8-3,0 | | Judías verdes | ≥ 0,98 | 4,9-5,5 | |
| | Ciruelas pasas | | 3,7-4,3 | Hortalizas Raíces y tubérculos | Patatas cocidas y peladas | | 5,4-5,9 | |
| | Melocotón | ≥ 0,98 | 3,4-4,2 | | Patatas en puré | | 5,1 | |
| | Zumo de cerezas | ≥ 0,98 | 3,4-3,6 | | Patatas fritas | <0,60 | | |
| Frutas de pepita | Manzanas | ≥ 0,98 | 3,4-3,5 | Remolacha | | 4,9-5,8 | | |
| | Manzana asada con azúcar | | 3,2-3,5 | Remolacha cocida | | 5,2-6,5 | | |
| | Zumo de manzana | ≥ 0,98 | 3,3-3,5 | Zanahorias rodajas | ≥ 0,98 | 5,3-5,6 | | |
| Frutas pequeñas | Frambuesas | ≥ 0,98 | 2,9-3,7 | Zanahorias cocidas | | 5,5-6,0 | | |
| | Fresas | ≥ 0,98 | 3,0-3,9 | Zanahorias en puré | | 4,5-5,8 | | |
| | Uvas | ≥ 0,98 | 3,5-4,5 | Zanahorias en zumo | ≥ 0,98 | 5,2-5,8 | | |
| | Zarzamoras | ≥ 0,98 | 3,0-4,2 | Hortalizas Setas | Setas | ≥ 0,98 | 6,0-6,5 | |
| | Zumo de arándanos | ≥ 0,98 | 2,5-2,7 | | Setas cocidas | | 6,0-6,2 | |
| | Zumo de grosellas | ≥ 0,98 | 3,0 | Hortalizas Solanáceas | Pimientos | ≥ 0,98 | 4,3-4,9 | |
| Otras frutas | Aceitunas negras | | 5,9-7,3 | | Tomates | ≥ 0,98 | 4,1-4,4 | |
| | Aguacates | | 6,2-6,5 | | Tomate concentrado | 0,93-0,98 | 4,1-4,4 | |
| | Dátiles | | 6,2-6,4 | Tomate en zumo | ≥ 0,98 | 3,9-4,4 | | |
| | Piña triturada, en rodajas | ≥ 0,98 | 3,2-4,1 | Hortalizas Tallos | Puerros | ≥ 0,98 | 5,4-5,6 | |
| | Zumo de piña | ≥ 0,98 | 3,4-3,7 | | Puerro cocido | | 5,5-6,1 | |

Anexo 9. Criterios, definiciones y acrónimos

CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LISTERIA MONOCYTOGENES

Tabla 11. Criterios microbiológicos de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes* (Capítulo 1 del Anexo I del Reglamento CE nº 2073/2005)

| Categorías de alimentos | Plan de muestreo (1) | | Límites (2) | | Método analítico de referencia (3) | Fase en la que se aplica el criterio |
|---|----------------------|---|----------------------|---|------------------------------------|--|
| | n | c | m | M | | |
| 1.1. ALC destinados a los lactantes, y ALC destinados a usos médicos especiales (4) | 10 | 0 | Ausencia en 25 g | | EN/ISO 11290-1 | Productos comercializados durante su vida útil |
| 1.2. ALC que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales | 5 | 0 | 100 ufc/g (5) | | EN/ISO 11290-2 (6) | Productos comercializados durante su vida útil |
| | | | Ausencia en 25 g (7) | | EN/ISO 11290-1 | Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido |
| 1.3. ALC que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4), (8) | 5 | 0 | 100 ufc/g | | EN/ISO 11290-2 (6) | Productos comercializados durante su vida útil |

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

(2) Para los puntos 1.1-1.25 m = M.

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

(4) En circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a este criterio para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo:

— los que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final),

— frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas, excluidas las semillas germinadas,

— pan, galletas y productos similares,

— aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares,

— azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate,

— moluscos bivalvos vivos,

— sal de cocina.

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

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

(7) Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.

(8) Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con $\text{pH} \leq 4,4$ o $\text{aw} \leq 0,92$, productos con $\text{pH} \leq 5,0$ y $\text{aw} \leq 0,94$, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

DEFINICIONES

Abuso de temperatura: temperatura mayor que la fijada para el procesado y almacenamiento al por menor, según las temperaturas establecidas en las normas nacionales o en los reglamentos comunitarios, incluyendo las condiciones de conservación domésticas razonablemente previsibles. El abuso de temperatura cubre toda la cadena alimentaria, tomando en consideración las desviaciones de temperatura de los expositores refrigeradores de los minoristas, así como la conservación en los hogares.

Actividad de agua (a_w): el término se refiere al agua no ligada disponible en el alimento, y no es lo mismo que el contenido en agua. El agua del alimento que no está unida a otras moléculas puede favorecer el crecimiento microbiano. La escala de la actividad de agua se extiende desde 0 a 1.0 (agua pura), aunque en la mayoría de los alimentos varía desde 0.2 para los muy secos hasta 0.99 para los alimentos frescos más acuosos.

Alimento listo para el consumo (ALC): alimento destinado por el productor o el fabricante al consumo humano directo, sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos.

Cadena del frío: sistema continuo que proporciona conservación en frío a los alimentos perecederos, desde la producción hasta el consumo.

Cepa de referencia (ISO 11133-1:2000): microorganismos definidos por lo menos, al nivel de género y especie, catalogados y descritos según sus características, y preferiblemente de origen conocido, normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.

Lote: grupo o conjunto de productos identificables, obtenidos por un proceso dado bajo circunstancias prácticamente idénticas y producido en un lugar dado dentro de un periodo de producción definido.

Muestreo: procedimiento utilizado para seleccionar una o más unidades.

pH: medición de la acidez o alcalinidad de un alimento; el pH 7 se considera neutro, por lo que valores menores de 7 se consideran ácidos, y los superiores son básicos o alcalinos.

Población: grupo o conjunto de unidades que son objeto de una investigación, relacionado con un proceso y una receta dada. En la práctica, el lote estudiado.

Subpoblación muestreada: la(s) unidad(es) seleccionada(s), que se suponen representativas de la población.

Unidad de prueba: alícuota de una unidad comercial, destinada a ser analizada.

Vida útil: periodo de tiempo anterior a la fecha de caducidad o de consumo preferente, según se define respectivamente en los artículos 9 y 10 de la Directiva 2000/13/CE.

ACRÓNIMOS

ALC: alimentos listos para el consumo

APPCC: análisis de peligros y puntos de control críticos

ATCC: American Type Culture Collection- Estados Unidos

CE: Comisión Europea

CEN: Centro Europeo de Normalización

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo- España

CIP: Collection de l'Institut Pasteur- Francia

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*)

ISO: Organización Internacional de Estandarización (*International Organization for Standardization*)

NCTC: National Collection of Types Cultures- Reino Unido

PCCs: puntos de control críticos

PCH: prácticas correctas de higiene

COLECCIÓN DOCUMENTOS TÉCNICOS DE HIGIENE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Nº 1 Reacciones de hipersensibilidad a los alimentos. Normativa de aplicación en el control oficial de los alérgenos presentes en alimentos.

Nº 2 Protocolo de verificación de etiquetado de alimentos.

Nº 3 Directrices de diseño, implantación y mantenimiento de un sistema APPCC y unas prácticas correctas de higiene en el sector de comidas preparadas.

Nº 4 Cuestionario para comprobar el grado de implantación del control de alérgenos en el sistema APPCC y GPCH de las industrias elaboradoras.

Nº 5 Nuevos alimentos e ingredientes alimentarios.



Dirección General
de Ordenación e Inspección

 Comunidad de Madrid