

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



Comunidad
de Madrid

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



**Comunidad
de Madrid**



Esta versión forma parte de la Biblioteca Virtual de la **Comunidad de Madrid** y las condiciones de su distribución y difusión se encuentran amparadas por el marco legal de la misma.



comunidad.madrid/publicamadrid

El presente documento se ha redactado únicamente con fines informativos. La Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental 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 y actualizado por:

- María Fernández Valentí. Responsable de la Comisión de Control de Riesgos Biológicos, año 2023. (Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental)
- Mercedes Sotodosos Carpintero. Jefa de Servicio de Evaluación de Riesgos Alimentarios, año 2023. (Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental)

Revisado por:

María Teresa Palomino López. Jefa del Área de Gestión y Evaluación de Riesgos Alimentarios.

Aprobado por:

Emma Sánchez Pérez. Subdirectora General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental

Edición tercera: noviembre de 2023
(Actualización de la 2ª edición de agosto de 2012)

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.

Elena Andradás Aragonés
Directora General de Salud Pública



Introducción

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

En esta 2ª edición de la Guía, se ha mantenido la redacción original, si bien se han modificado algunos apartados para incluir las versiones actualizadas de las recomendaciones técnicas para realizar y verificar Estudios de Vida Útil que se detallan en los siguientes documentos comunitarios y de la AESAN:

- *Documento Guía de la Comisión Europea (CE, 2008 a)*, dirigido a las **empresas alimentarias** (SANCO 11510/2013)
- *Documento Guía técnica del Laboratorio Comunitario de Referencia para *Listeria monocytogenes* (CE, 2008 b)*, dirigido a los **laboratorios**. Versión 4- 1 de julio de 2021 (EURL. Lm Guide)
- Documento para la evaluación de la competencia de laboratorios que realizan test de desafío en relación con *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Versión 3- 10 de febrero de 2023 (EURL Lm Guidance)
- Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo de la AESAN (Aprobado en la Comisión Institucional de 16/10/2019)
- Informe del Comité Científico de la AESAN en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios (AESAN-2011-003)
- Informe del Comité Científico de la AESAN sobre la verificación de estudios de vida útil en relación a *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (AESAN-2019-001)

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 la AESAN



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.

Se termina relacionando los ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS y OTRA INFORMACIÓN posible, destacando sus aplicaciones prácticas, ventajas y limitaciones.

Los ANEXOS se han reservado para la información más aplicativa y práctica:

- El [Anexo 1](#), con árbol de decisiones y ejemplos de su uso, orienta a las empresas alimentarias para comenzar a abordar los estudios de vida útil a realizar.
- En el [Anexo 2](#) se muestran los beneficios y limitaciones de los distintos ensayos laboratoriales (ensayos de desafío y ensayos de durabilidad).
- En el [Anexo 3](#) se ilustra el uso de los modelos matemáticos de microbiología predictiva. Los [Anexos 4, 5, 6 y 7](#), contienen los protocolos de trabajo recomendados para los laboratorios de ensayo que practican las pruebas analíticas.
- En el [Anexo 8](#) se muestra un diagrama-esquema para la realización de ensayos de desafío.
- El [Anexo 9](#) 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 10](#) hemos recopilado algunos valores publicados de pH y actividad de agua de distintos alimentos listos para consumo, a modo de ejemplo y orientación.
- En el [Anexo 11](#) 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	8
1. EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL COMBINANDO DIFERENTES HERRAMIENTAS	11
2. COLABORACIÓN ENTRE EMPRESAS ALIMENTARIAS	12
3. DOCUMENTACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL	13
CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA	14
1. CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO	15
2. BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA	18
1. HISTÓRICO DE DATOS	21
MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA (MODELOS MATEMÁTICOS)	22
3. PRUEBAS DE LABORATORIO ESPECÍFICAS	27
3.1. ESTUDIOS DE DURABILIDAD	29
3.2. ENSAYOS DE DESAFÍO	30
3.2.1. ENSAYOS DE DESAFÍO PARA VALORAR EL POTENCIAL DE CRECIMIENTO	32
3.2.2. ENSAYOS DE DESAFÍO PARA ESTIMAR LA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO (ESTUDIOS DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO)	34
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	37
ANEXO 1. ÁRBOL DE DECISIONES PARA REALIZAR ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL	37
ANEXO 2. BENEFICIOS/LIMITACIONES DE LOS ENSAYOS DE DESAFÍO PARA EVALUAR EL POTENCIAL DE CRECIMIENTO, LA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO Y DE LOS ESTUDIOS DE DURABILIDAD.	41
ANEXO 3. EJEMPLOS DEL USO DE MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	42
ANEXO 3. EJEMPLOS DEL USO DE MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	43
ANEXO 3. EJEMPLOS DEL USO DE MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	44
ANEXO 3. EJEMPLOS DEL USO DE MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	45
ANEXO 4. PROTOCOLO DE ESTUDIOS DE DURABILIDAD.	46
ANEXO 5. ENSAYOS DE DESAFÍO: PRERREQUISITOS ANTES DE INICIAR UN ENSAYO DE DESAFÍO	51
ANEXO 6. PROTOCOLO DE LOS ENSAYOS DE DESAFÍO PARA EL POTENCIAL DE CRECIMIENTO	52
ANEXO 7. PROTOCOLO DE ENSAYOS DE DESAFÍO PARA LA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO ...	62
ANEXO 8	70
ANEXO 9. LISTADO DE VERIFICACIÓN DE DIRECTRICES TÉCNICAS	71
ANEXO 10. EJEMPLOS DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	81
ANEXO 11. CRITERIOS, DEFINICIONES Y ACRÓNIMOS	83



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)

Características del producto y bibliografía científica
<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.
Estudios complementarios: tendrán en cuenta la variabilidad inherente al producto , los microorganismos en cuestión y las condiciones de transformación y almacenamiento
<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 que supongan un cambio sustancial en el producto ya existente (procesado, formulación, etc)
- Cuando previamente no hayan realizado estudios de vida útil.
- Cuando los resultados del autocontrol o del control oficial indiquen que la vida útil del producto no es la idónea.

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. 7-10° 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 organoléptica bajo las condiciones previsibles de almacén y uso.

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 *L. monocytogenes* también debe tenerse en cuenta, así como todas las **condiciones razonablemente previsibles 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 **Anexo1** 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 cuándo 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



Consideraciones previas

1. Evaluación de la vida útil combinando diferentes herramientas

En la práctica, el establecimiento de la vida útil, se considera parte del sistema basado en los principios del APPCC del operador, y tiene en cuenta los controles sobre los proveedores que garanticen la calidad de las materias primas y las tendencias de los resultados de los controles de las buenas prácticas de higiene aplicados en el entorno de fabricación.

Como paso previo para sacar un nuevo alimento listo para el consumo (ALC) al mercado, el responsable del mismo tendrá que VALIDAR su vida útil respecto a *Listeria monocytogenes*. El procedimiento para validar la vida útil consiste en obtener evidencia suficiente, utilizando las herramientas que sean necesarias entre las señaladas en el ANEXO II del Reglamento 2073/2005 (caracterización físico-química del producto, consulta de la bibliografía científica, modelos matemáticos de crecimiento, ensayos de desafío y ensayos de durabilidad), siempre teniendo en cuenta la variabilidad inherente al producto, los microorganismos en cuestión, así como las condiciones razonablemente previsibles de transformación y almacenamiento, de que la medida de control establecida (vida útil) es adecuada.

Una vez establecida la vida útil del alimento, el operador tendrá que establecer los controles adecuados (controles de parámetros que limitan el crecimiento de *Listeria*, como pH o AW del producto, conservantes, atmósfera de envasado, etc, y, en caso necesario, analíticas de producto al final del proceso de fabricación y/o de la vida útil) para VERIFICAR que, con la vida útil establecida, el límite para *Listeria monocytogenes* de 100 ufc/g, no se superará en el momento del consumo.



Consideraciones previas

2. Colaboración entre empresas alimentarias

Tal como indica el artículo 3 del Reglamento 2073/2005, “*Las empresas alimentarias podrán colaborar en la realización de dichos estudios (de vida útil)*”, y, “*En las guías de prácticas correctas contempladas en el artículo 7 del Reglamento (CE) no 852/2004 podrán incluirse directrices para el desarrollo de dichos estudios.*”

Con independencia de esta colaboración, es importante que la empresa tenga en cuenta las condiciones específicas 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, aw, 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, en caso contrario, deben evaluarse los efectos de los ingredientes sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- El proceso de producción debe ser similar. Las etapas del proceso se deben comparar con detalle y evaluar 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*,
- 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, o, **si los productos no son similares, 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.



Consideraciones previas

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 *Listeria monocytogenes*, la duración de la vida microbiológica deberá garantizarse con las Prácticas Correctas de Higiene y la aplicación de los Puntos de Control Críticos.

Se contemplan dos tipos de estudios obligatorios iniciales:

1. Características del producto
2. Bibliografía científica



Características del producto y bibliografía científica

1. Características del producto

El primer paso en los estudios de vida útil, tal como se establece en el ANEXO II del reglamento de criterios microbiológicos, es la determinación de las **"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"**. Todos estos factores (propiedades intrínsecas y extrínsecas del alimento) nos permiten determinar si el alimento puede favorecer la supervivencia o el crecimiento de *L. monocytogenes*. Además, una vez conocidas las características del producto podemos compararlo con productos similares descritos en la bibliografía científica, usar los datos obtenidos en modelos de microbiología predictiva, así como diseñar los estudios laborales (ensayos de desafío o estudios de durabilidad) en caso de que sean necesarios. Por tanto, **sin conocer las características fisicoquímicas del producto, no se puede empezar ni dar por válido un estudio de vida útil.**

Se enumeran a continuación las principales propiedades intrínsecas y extrínsecas a tener en cuenta, y se describe brevemente cómo influyen en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en el alimento:

1. Propiedades intrínsecas:

- Características físico-químicas:
 - **pH**
 - **aw**
 - **contenido en sal/azúcar y humedad**
 - **concentración de conservantes (ácidos orgánicos, nitritos)**
 - estructura (sólido, líquido)
- Microflora habitual asociada (recuento total) o específica (bacterias ácido-lácticas, Pseudomonas)

2. Propiedades extrínsecas:

- Temperaturas de conservación razonablemente previsibles en todas las fases de la cadena alimentaria: producción, almacenamiento, transporte, minorista y consumidor
- Vida útil prevista (tiempo de almacenamiento)
- Sistema de envasado: aire, vacío, atmósfera modificada, permeabilidad del material de envasado
- Humedad relativa durante el almacenamiento para productos sin envasar
- Para productos envasados en atmósfera modificada la composición del gas de envasado.

3. Es necesario también conocer el proceso productivo: Tratamientos térmicos, condiciones de maduración, productos loncheados o manipulados después de un tratamiento bactericida, tipo de envasado,

Las características más importantes son el pH, la actividad de agua (aw) y el tiempo/temperatura de conservación, por lo que se deben describir e identificar su rango de variación inter e intra-lotes del alimento, además, se debe tener en cuenta que tanto el pH como la aw pueden variar a lo largo de la vida útil del alimento (por ejemplo, en los quesos y otros productos madurados).



Características del producto y bibliografía científica

El **pH** mide la acidez o alcalinidad de un alimento, oscila en el rango de 0-14 ($\text{pH} < 7$ se considera ácido, $\text{pH} > 7$ se considera alcalino). La **a_w (actividad de agua)** mide la cantidad de agua libre en el alimento disponible para el crecimiento microbiano (no se debe confundir con la humedad del alimento), y oscila en un rango de 0-1.

La legislación clasifica automáticamente un ALC en la categoría de alimentos que NO pueden favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* (categoría 1.3) 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
- Otras categorías de productos siempre que se justifique científicamente

Para poder incluir directamente un ALC en la categoría 1.3 del reglamento, tenemos que conocer los valores medios (con su desviación estándar) de pH y/o a_w del mismo: estos valores deben medirse en **al menos 3 lotes de alimento y con al menos 5 mediciones por lote**, para tener en cuenta la variabilidad inter e intra lotes. Esto es importante, ya que, pequeñas variaciones en el pH o la a_w , pueden tener un impacto importante en el crecimiento de *Lm*.

Para utilizar **el pH y/o la a_w** como factor limitante del crecimiento de *Lm*, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha implementado a través de la red BIOQURA las siguientes herramientas para apoyar estudios de vida útil:

- T102 (Muestras con $a_w > \text{límite}$) calcula la proporción de muestras con una actividad del agua superior a un límite en base a un muestreo.
- T103 (Muestras con $\text{pH} > \text{límite}$) calcula la proporción de muestras con un pH superior a un límite en base a un muestreo.

disponibles en el enlace: <https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/> que permiten calcular, con los valores medios, desviación estándar y número de mediciones, el porcentaje de muestras que tendrían un pH y/o a_w superior al admisible.

Si la clasificación del alimento se basa en la combinación de diferentes factores, como **pH y a_w** , una vez conocidos los datos, y, si los valores de pH y a_w calculados son consistentes, pero, bien por separado, bien combinados, no coinciden con los establecidos en el Reglamento, se pueden utilizar herramientas de microbiología predictiva, como el módulo de probabilidad de crecimiento del programa "Sym'Previous" (que indica combinaciones de pH y a_w que pueden inhibir el crecimiento de *Lm* a una temperatura dada), o el *Lm* growth boundary del programa "Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)" (que indica la probabilidad de que *Lm* crezca en el alimento en función de combinaciones de distintos ácidos orgánicos) (ver microbiología predictiva).

En el **Anexo 10** se recopilan los valores de actividad de agua y de pH publicados para distintos tipos de alimentos, a modo de ejemplos orientativos.



Características del producto y bibliografía científica

La **formulación** del alimento es muy importante, en el caso de alimentos multi-componentes, (por ejemplo, un sándwich), estos valores no se calcularán para el alimento homogeneizado, sino para cada uno de los componentes (pan y relleno). Se debe tener en cuenta, además, que estos factores pueden variar a lo largo de la vida útil (por ejemplo, en alimentos sometidos a fermentación y/o desecación, (como quesos, jamones curados, etc).

La concentración de **conservantes** también debe tenerse en cuenta: la adición de ácidos orgánicos (como el diacetato, el ácido sórbico, los lactatos etc), la lisozima, bacteriocinas como la nisina, aceites esenciales como el timol, polímeros naturales como el quitosán, y sustancias formadas durante el procesado como los polifenoles en productos ahumados, han demostrado su efectividad para retrasar el crecimiento de *Listeria*.

La **microflora** habitualmente asociada al alimento influye, bien por competir por los recursos con la *Listeria*, bien alterando el ambiente (como las bacterias lácticas que bajan el pH), o produciendo sustancias inhibitoras (los lactococcus producen nisina).

Además, **la estructura del alimento** es importante, ya que influye en la distribución del agua y de los conservantes en el alimento, y en la movilidad de los microorganismos, en medios líquidos los microorganismos se distribuyen de forma uniforme, pero en medios sólidos no.

Entre los factores extrínsecos, la **temperatura de almacenamiento** tiene un impacto decisivo en el crecimiento de *Listeria*, y, hay que considerar que puede haber abusos de temperatura durante la producción, distribución y almacenamiento y uso por el consumidor.

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*.

En cualquier caso, si utilizamos estos parámetros para demostrar que el alimento no permite el crecimiento de *Listeria*, tendremos que controlarlos como Puntos de Control Crítico (PCC), se puede considerar que el alimento se puede incluir en el grupo de alimentos que no permite el crecimiento de *L. monocytogenes* y se podría establecer un límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil.

A modo de resumen, en la siguiente tabla se muestran los **principales parámetros del alimento que tienen impacto en el crecimiento de *Listeria monocytogenes***

FACTORES INTRÍNSECOS

- pH
- **A_w*** (actividad de agua) o contenido de sal/azúcar y humedad
- Ácidos orgánicos, nitritos
- Conservantes
- Microflora intrínseca
- Estructura del alimento

* la actividad de agua es la cantidad de agua disponible para el crecimiento bacteriano

FACTORES EXTRÍNSECOS

- T^a de la cadena de frío (fabricante, almacenamiento, transporte y consumidor)
- Humedad relativa del aire (para alimentos no envasados)
- Tipo de envasado del producto final (con/sin vacío, atmósfera modificada, y, permeabilidad del envase)
- Composición de la atmósfera modificada en su caso



Características del producto y bibliografía científica

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 este punto, la consulta de bases de datos en relación con la supervivencia y crecimiento de microorganismos (en concreto, *L. monocytogenes*) es interesante y útil, además de facilitar enormemente la tarea de búsqueda. Éste es el caso de la base de datos disponible en el portal ComBase (*ComBase Browser*) que actualmente contiene más de 8.000 registros de experimentos sobre el comportamiento de *Listeria* (*L. innocua* y *L. monocytogenes*) en diferentes matrices (medio de cultivo y diversos alimentos).

En la tabla 2 se recogen algunos límites para la supervivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes*, así como el impacto de algunos tratamientos industriales, 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*, e impacto de algunos tratamientos industriales

Factores	Puede crecer			Puede sobrevivir * (pero no crecer)
	Límite inferior	Óptimo (más rápido)	Límite superior	
Temperatura (° C)	-2	30.0 a 37.0	45.0	-18.0
pH **	4.0 a 4.3	7.0	9.6	3.3 a 4.2
Actividad de agua (a_w)	0.92 (0.90 con glicerol)	0.99	> 0.99	< 0.90
Concentración de sal (%) ***			12	≥ 20
Atmósfera	Anaerobio facultativo (puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno, p.e. en envases al vacío o en atmósfera modificada)			
Desinfectantes	Deben estar autorizados para uso en industria alimentaria. Es sensible siempre que se sigan las instrucciones de uso. Algunos clones son resistentes a los compuestos de amonio cuaternario.			
Tratamiento térmico durante la elaboración	D _{65°C} = 0.2 a 2 min, z = 7.5°C (4 to 11°C) (en leche desnatada)			
Inactivación por altas presiones hidrostáticas	500 a 600 MPa de 5 a 10 min a 20°C-logran 3 a 5 log ₁₀ reducciones (en productos cárnicos) 350 MPa de 5 a 10 min a 20°C logran 3 a 5 log ₁₀ reducciones (en productos ácidos como zumos de frutas y mermeladas)			
Radiaciones ionizantes	D ₁₀ (dosis de radiación ionizante en kGy, para obtener una reducción decimal en la población del microorganismo en cuestión) =0.56 (0.25 - 0.77) kGy 8depende de la temperatura)			

* 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.

(Tomado de ANSES data sheet on biological hazards "*Listeria monocytogenes*" abril 2020)



Características del producto y bibliografía científica

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 alimentos 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**.

En cualquier caso, la utilización de los datos obtenidos de la bibliografía científica, tiene las siguientes **limitaciones** al establecer la vida útil de un alimento:

- Es necesario tener conocimientos suficientes de microbiología, para poder ser crítico con los resultados de la búsqueda.
- Normalmente es difícil que el operador alimentario tenga acceso a datos de literatura científica.
- La información de los estudios de investigación, no suele estar en un formato fácil de entender para el operador alimentario.
- Es difícil encontrar información que coincida exactamente o pueda extrapolarse al producto en estudio.



Estudios complementarios

Cuando en base a las características del producto y su comparación con la bibliografía científica, no se puede concluir que *Listeria monocytogenes* no crece en el alimento, hacen falta estudios complementarios. Estos estudios se realizarán **tomando como base los estudios referidos a las características del producto y a la bibliografía científica**, teniendo 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 todas estas fuentes asociadas**, dadas las limitaciones de cada una de ellas.



Estudios complementarios

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 autocontrol, 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 confirmar que la vida útil asignada a los ALC es correcta 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, bien en la misma empresa, o cuando en la realización de los estudios colaboran distintas empresas.
- 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 disponibles. **Cuanto más unidades del alimento se hayan analizado, más fiable será el histórico de datos. No obstante, no es posible recomendar un número determinado de datos, ya que, se trata de un enfoque basado en el riesgo, y que depende del proceso de elaboración y naturaleza del alimento.**

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.



Estudios complementarios

2. Microbiología predictiva (Modelos matemáticos)

La microbiología predictiva, se define como el campo de estudio que combina elementos de la microbiología, matemáticas y estadística para desarrollar modelos que, además de describir, también predigan matemáticamente el crecimiento o muerte de microorganismos cuando se ven sometidos a factores específicos como: pH, Temperatura (T), actividad de agua (a_w), entre otros. A partir del conocimiento de las respuestas microbianas ante tales factores del entorno, se formulan ecuaciones matemáticas que indican un comportamiento, ya sea de crecimiento, supervivencia o inactivación. La microbiología predictiva está basada en la premisa de que las respuestas de poblaciones de microorganismos a factores medioambientales son reproducibles, y, por lo tanto, es posible, interpolando entre puntos, predecir el comportamiento de esos microorganismos para condiciones que no han sido ensayadas.

Los parámetros de las ecuaciones matemáticas se pueden haber determinado a partir de pruebas realizadas con los alimentos, 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 están 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, cuyo uso vamos a detallar, son:

- [Pathogen Modelling Programme](#)
- [ComBase Predictor](#)
- Combase Premium
- Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)
- Sym'previus

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.



Estudios complementarios

Otros modelos se han desarrollado para predecir el comportamiento de los microorganismos en alimentos particulares, cualesquiera que sean sus condiciones de conservación. El [Anexo 3](#) muestra ejemplos del uso de la microbiología predictiva.

Siempre que se conozcan sus limitaciones y sean 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** de tipo probabilístico sobre **límites de crecimiento (growth boundaries) o interfase entre crecimiento/no crecimiento (G/NG, del inglés growth/no-growth)**, permiten estimar la probabilidad de que un microorganismo crezca en función de uno o más factores ambientales. Estos modelos permiten identificar la combinación de factores que permite el crecimiento con un nivel de probabilidad determinado. Se considera que una probabilidad del 0,1 (es decir, un 10%) indica que hay condiciones inhibitorias; una probabilidad del 0,5 (un 50%) se sitúa en la frontera (límite o boundary) entre G/NG y una probabilidad del 0,9 (un 90%) significa que hay una alta probabilidad de crecimiento. En este sentido, los modelos sobre límites de crecimiento microbiano, son una herramienta valiosa para cuantificar los efectos de la combinación de factores (la tecnología de barreras) y diseñar productos mínimamente procesados. Estos modelos son especialmente interesantes para estimar los límites de crecimiento con determinados factores que, presentes aisladamente, no inhiben el crecimiento, pero sí que lo pueden hacer cuando se presentan en combinación con otros factores barrera, y, pueden ayudar a las empresas alimentarias a categorizar sus ALC y encuadrarlos en la categoría 1.3 "Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a lactantes ni para usos médicos especiales". Entre los más utilizados tenemos:
 - Sym'previus (módulo de interfase de crecimiento), se accede mediante suscripción, y permite simular la influencia del pH, a_w , T^a y concentración de ácido láctico en la probabilidad de crecimiento de *Listeria*. Disponible en <https://symprevius.eu/en/>
 - Food Spoilage and Safety Predictor: este programa incluye una aplicación con un modelo de los límites de crecimiento/no crecimiento de *L. monocytogenes* en función de doce factores ambientales, con un intervalo de aplicabilidad relativamente amplio. Aunque originalmente se desarrolló para productos de la pesca, se ha validado con numerosos datos externos y se ha comprobado que también funciona correctamente con productos cárnicos listos para el consumo. En este caso, el modelo utiliza el parámetro ψ (*psi*), que cuantifica la distancia entre una combinación de condiciones ambientales y el límite de crecimiento, teniendo en cuenta las posibles interacciones entre factores. Para identificar las características de los productos que permitirían inhibir el crecimiento, se recomienda utilizar un valor $\psi = 2$. Este valor proporciona un margen de seguridad para que pequeñas variaciones de las características del producto, generalmente difíciles de evitar, no se conviertan en condiciones que favorezcan el crecimiento del patógeno.

El modelo se puede descargar en: <http://fssp.food.dtu.dk/windowsdownload.aspx>



Estudios complementarios

Con estos modelos, hay que tener en cuenta que, la transición entre las condiciones que favorecen y las que no favorecen el crecimiento microbiano, a menudo es muy estrecha, y, pequeños cambios en las características del producto o en las condiciones de conservación, pueden hacer que un producto pase de no favorecer a favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*.

- **Los modelos “de simulación de crecimiento”**, 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 procesado inherente y la variabilidad del alimento y de las condiciones de conservación. Predecir **el tiempo de latencia** (adaptación) de los microorganismos en un alimento es difícil, ya que se trata de un parámetro que, no solamente depende de las condiciones ambientales, sino también del estado fisiológico del microorganismo en el momento de contaminar el producto. Dependiendo del estado fisiológico del microorganismo y de las diferencias entre las condiciones de origen (fuente de contaminación) y las de llegada (alimento contaminado), el tiempo de latencia puede variar entre 0 (se inicia el crecimiento sin fase de adaptación) e infinito (no hay crecimiento). Por este motivo, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, a menudo se adopta una actitud conservadora y se obvia la fase de latencia.

En cambio, **la velocidad específica de crecimiento**, es un parámetro independiente del estado fisiológico del microorganismo. En la bibliografía científica se pueden encontrar muchos modelos matemáticos que describen el comportamiento de *L. monocytogenes* en diversas matrices, sean un medio de laboratorio o alimentos líquidos o sólidos, en función de factores como la temperatura, el pH, la a_w (o concentración de solutos como la sal y/o el azúcar), determinados ácidos orgánicos débiles, bacteriocinas y otros conservantes, pero, para que sean útiles, se requiere una validación previa que confirme la adecuación del modelo al producto y a las condiciones de conservación.

Para llevar a cabo simulaciones, hay que escoger el modelo más adecuado al objetivo del estudio, que tenga en cuenta los factores más relevantes para el producto y con un intervalo de aplicación que incluya los valores de las características del producto, que previamente se habrán tenido que determinar, y las condiciones de conservación razonablemente previsibles.



Estudios complementarios

Entre los programas informáticos más utilizados tenemos:

- [Pathogen Modelling Programme](https://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx), del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, disponible en internet en el siguiente enlace: <https://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx>, incluye modelos para diversos microorganismos, entre ellos para *L. monocytogenes*. Las aplicaciones del PMP consideran la influencia de cuatro factores ambientales: el pH, concentración de sal, la concentración de nitrito y la temperatura, en condiciones aerobias o anaerobias, en modelos construidos a partir de datos obtenidos de ensayos en medio de cultivo, de composición más sencilla que la que normalmente presentan los alimentos. También dispone de modelos de crecimiento, supervivencia e inactivación térmica, desarrollados en algunos alimentos, como, por ejemplo, el modelo para calcular el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado, teniendo en cuenta la concentración de sal y de fenoles.
- [ComBase Predictor](https://www.combase.cc/index.php/en/), resultado de la colaboración entre Reino Unido, Estados Unidos y Australia, disponible en el enlace <https://www.combase.cc/index.php/en/>, tiene aplicaciones sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en función del pH, aw/concentración de sal, la temperatura y un cuarto factor para cada una de las cuatro aplicaciones disponibles: nitrito, CO₂, ácido láctico/lactado o bien ácido acético/acetato, respectivamente. El sistema permite comparar las predicciones que proporcionan las diferentes aplicaciones, y ofrece la posibilidad de hacer simulaciones en condiciones cambiantes (dinámicas) de temperatura. Dado que los modelos se basan en experimentos en medio de laboratorio, hay que ser prudentes a la hora de interpretar las predicciones obtenidas, y tener en cuenta el intervalo de confianza de las predicciones, que se muestran en la pestaña "uncertainty" de la aplicación.
- Combase Premium, disponible en el enlace: <https://www.cbpremium.org/Home>, desarrollado por la universidad de Tasmania (Australia), es de acceso libre y en él se pueden encontrar modelos predictivos de crecimiento dependiendo de la temperatura de almacenamiento para distintos alimentos. Este sistema, es útil siempre que haya un modelo cuyas características de los modelos (pH, Aw, concentración de conservantes, etc), coincidan con nuestro alimento.



Estudios complementarios

- [Food Spoilage and Safety Predictor \(FSSP\)](http://fssp.food.dtu.dk/windowsdownload.aspx), del Instituto Nacional Danés de Alimentación, se puede descargar en el enlace: <http://fssp.food.dtu.dk/windowsdownload.aspx>, Incluye dos aplicaciones sobre la predicción del comportamiento de *L. monocytogenes* en función de hasta doce factores ambientales (Figura 11). El sistema dispone también de una aplicación para valorar la interacción entre *L. monocytogenes* y las bacterias del ácido láctico en productos de la pesca, productos cárnicos y queso Cottage, principal grupo microbiano relacionado con la alteración de muchos productos listos para el consumo envasados. En todas las aplicaciones, el sistema permite hacer simulaciones en condiciones cambiantes de temperatura, y también importar los datos de un registrador de temperatura (*data logger*). De entre los sistemas listados, es probablemente el más versátil gracias al gran número de factores que tiene en consideración. Aunque originalmente se desarrolló para productos de la pesca, se ha validado con numerosos datos externos y en su versión actual, también funciona correctamente con otros alimentos listos para el consumo.
- Sym´previus: el modelo de simulación de crecimiento del Sym´previus disponible en <https://symprevius.eu/en/>, está sujeto a suscripción. Es un modelo especialmente útil cuando el usuario dispone de sus propios datos de prevalencia y concentración de *Listeria*, y ensayos de desafío en el alimento listo para el consumo en cuestión, siempre llevados a cabo según la norma EN ISO 20976-1 y el Documento técnico sobre estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo.

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) y condiciones de procesado, 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.

Estudios complementarios

3. Pruebas de laboratorio específicas

En el "Documento técnico sobre estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo", elaborado por el laboratorio europeo de referencia para *Listeria monocytogenes* (en adelante: Documento de orientación técnica EURL *Lm*) se ofrecen directrices sobre cómo realizar los estudios laboratoriales complementarios recogidos en el Anexo II del Reglamento (CE) nº 2073/2005 adoptados para establecer la vida útil de los alimentos listos para el consumo respecto a *Lm*, es específico para *Lm* en ALC, y debe leerse junto con la norma EN ISO 20976-1 "Directrices y requisitos para la realización de ensayos de desafío de productos alimenticios y piensos. Parte 1: ensayos de desafío para estudiar el potencial de crecimiento, el tiempo de latencia y la velocidad máxima de crecimiento para bacterias y levaduras que no formen micelio".

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 para verificar que la vida útil establecida para el alimento es correcta, cuando la prevalencia de *L. monocytogenes* es elevada y los niveles de contaminación iniciales son bajos.

En el [Anexo 2](#), se muestra un cuadro con los beneficios y limitaciones de los ensayos laboratoriales



Estudios complementarios

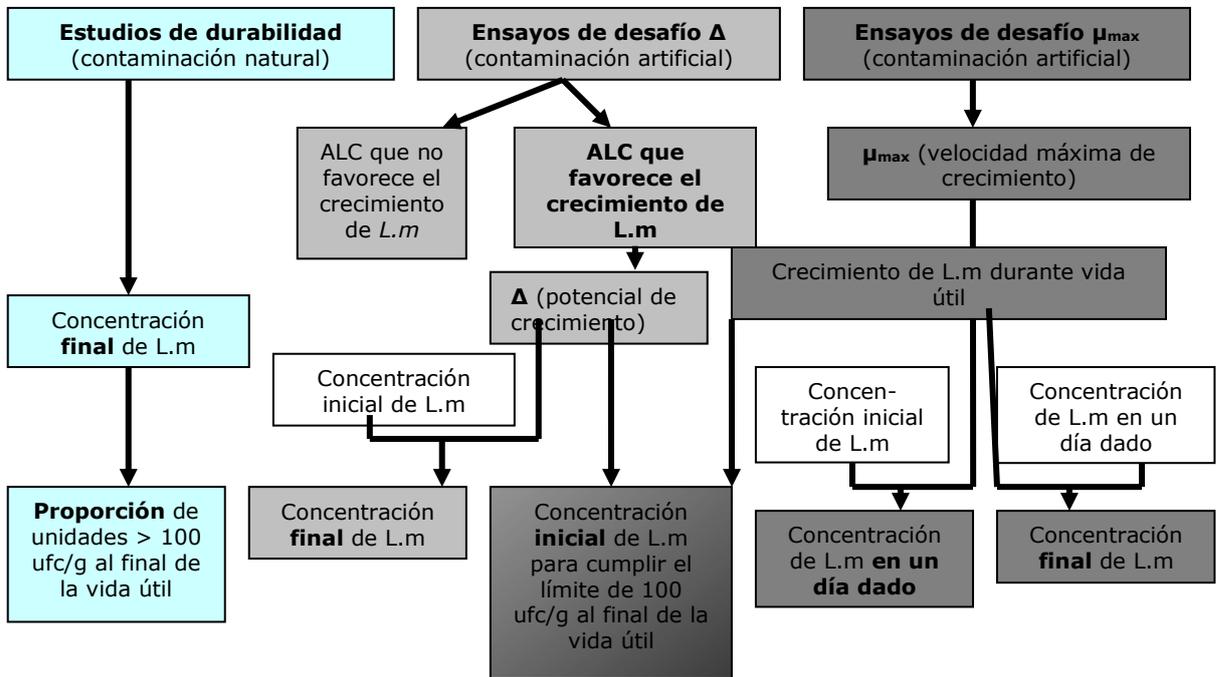


Figura 1. Datos obtenidos de los ensayos de desafío y los estudios de durabilidad.

Estudios complementarios

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 útil se estima la proporción de ALC que supera el límite cuantitativo de 100 ufc/g.

Los estudios de durabilidad pueden considerarse **más realistas que las pruebas de inoculación** 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 **no son útiles por sí mismos para validar** la vida útil microbiológica de un alimento listo para el consumo, respecto a *Lm* debido a:

- 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 (prevalencia menor de un 10%), o si el nivel de contaminación inicial es escaso en la gran mayoría de los productos, 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.

Combinar los estudios de durabilidad con otros, como los ensayos de desafío o la microbiología predictiva, contribuye a validar la vida útil de un ALC en relación con *Listeria monocytogenes*.

Los estudios de durabilidad pueden resultar adecuados en los dos casos siguientes:

- a) Para ALC que favorezcan el crecimiento de *Lm*, y que suelen estar contaminados con niveles bajos de *Listeria*, para verificar la vida útil establecida
- b) En ALC que no suelen estar contaminados con *Listeria*, pero en los que un lote se contamina de manera accidental con *Lm*, para evaluar el crecimiento de *Listeria* en casos de contaminación natural.

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 según el Documento de orientación técnica EURL *Lm*, se describe en el [Anexo 4](#).



Estudios complementarios

3.2. Ensayos de desafío

Los ensayos de desafío permiten validar la vida útil de un alimento listo para el consumo bajo unas condiciones de almacenamiento determinadas, dando información sobre **el comportamiento de *Lm* (crecimiento, supervivencia o disminución) cuando se inocula de manera artificial en el alimento**. Deben tener en cuenta la variabilidad de los alimentos (usando diferentes lotes) y de las cepas (inoculando distintas cepas, y, si es posible, alguna de ellas aislada 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**).

En estas pruebas resulta difícil imitar el nivel de contaminación, su distribución heterogénea y el estado fisiológico de las bacterias, ya que, el método de contaminación no siempre representa por completo la contaminación natural. 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.

Antes de iniciar un ensayo de desafío, la empresa deberá facilitar al laboratorio **información relevante** sobre el producto a estudiar, lo que permitirá identificar los factores que pueden tener un impacto en el crecimiento de *Lm* para priorizar su medición y, demostrar que los productos analizados durante los ensayos, son representativos de la producción.



La información que necesita el laboratorio es la siguiente:

- Descripción del producto especificando si es una nueva formulación, un nuevo producto o un producto que ya tiene un historial de producción
- Condiciones de procesamiento, especialmente tratamientos térmicos, secado, ahumado, maduración, troceado, loncheado pos-tratamiento, salado, congelación, descongelación, tipo de envasado
- Composición
- Características físico-químicas y microbiológicas del producto, teniendo en cuenta la variabilidad inter e intra lotes. Para algunos alimentos, es importante destacar cómo varían dichas características a lo largo de la vida útil (por ejemplo, los valores de pH en productos fermentados como quesos, o valores de a_w en jamón curado o quesos duros).
- Condiciones de envasado del producto final (fotografía del producto)
- Condiciones razonablemente previsibles de almacenamiento durante la vida útil, teniendo en cuenta fases de producción, transporte, venta al por menor y almacenamiento en lugar de consumo
- Vida útil, instrucciones de uso que figuren en el etiquetado y condiciones razonablemente previsibles de uso (por ejemplo, debe tenerse en cuenta que, muchos productos vegetales congelados que teóricamente se deberían consumir cocinados, se consumen crudos)

Para realizar un ensayo de desafío se deben considerar como mínimo los siguientes factores:

- ✓ Tener en cuenta la variabilidad inter lotes, intra lotes y la derivada de la inoculación artificial de las unidades de test.
- ✓ Número de lotes y elección de los mismos.
- ✓ 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
- ✓ Cálculos (del potencial de crecimiento o de la velocidad máxima de crecimiento según el tipo de estudio)
- ✓ Explotación de los resultados e informe del ensayo.



Estudios complementarios

3.2.1. Ensayos de desafío para valorar 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 periodo de ensayo comienza el día en que tiene lugar la contaminación y finaliza al final de la vida útil.

El potencial de crecimiento (Δ) es la diferencia entre el \log_{10} ufc/g de *Listeria monocytogenes* más alto que se haya observado a lo largo del ensayo, y el \log_{10} ufc/g al principio del mismo. 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: pueden aplicarse adaptaciones a las cepas a inocular para simular el estado fisiológico de las bacterias que puedan contaminar el producto, por ejemplo, las cepas que contaminan productos cárnicos cocidos, loncheados y envasados al vacío, procederán de un ambiente frío, y por tanto las cepas a inocular, deberán adaptarse a crecer en condiciones frías.
- Las propiedades intrínsecas del alimento (p.e. pH, contenido de NaCl, aw, contenido nutricional, microflora asociada, constituyentes antimicrobianos) Algunos de estos factores pueden variar dentro de un lote (variabilidad intra-lote), o, entre lotes (variabilidad inter-lotes), y, estas variabilidades deben abordarse antes de iniciar un ensayo de desafío.
- Las propiedades extrínsecas (p.e. perfil tiempo/ temperatura, atmósfera).



Estudios complementarios

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

- Clasificar un alimento: Para el caso concreto de *Listeria monocytogenes*
 - Cuando $\Delta > 0.5 \log_{10} \text{ ufc/g}$, 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" (catgoría 1.2).
 - Cuando $\Delta \leq 0.5 \log_{10} \text{ ufc/g}$, 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" (catgoría 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 inicial de *L. monocytogenes* en el punto de producción, con la cual no se superaría el nivel de 100 ufc/g al final de la vida útil.

Las **ventajas** principales de este método son su relativa facilidad de ejecución y que los resultados se pueden aplicar directamente (ver arriba). Además tiene en cuenta la fase de latencia a la temperatura del estudio.

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....).

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



Estudios complementarios

3.2.2. Ensayos de desafío para estimar la velocidad máxima de crecimiento (estudios de cinética de crecimiento)

Un ensayo de desafío microbiológico para valorar la velocidad máxima de crecimiento es un **estudio laboratorio que mide la velocidad máxima de crecimiento de *L. monocytogenes* en un alimento inoculado artificialmente, conservado a una temperatura constante** (normalmente, entre 6 y 10°C). 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 tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) de la cepa de *L. monocytogenes* 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} . Si la concentración se expresa en \log_{10} ufc/g en función del tiempo, se obtiene la velocidad máxima de crecimiento (v_{\max}).

En las publicaciones científicas y en la mayoría de las herramientas predictivas en microbiología, se suele hablar de μ_{\max} , para evitar confusiones es esencial prestar atención a las unidades. La relación para pasar de un valor a otro es: $\mu_{\max} = v_{\max} * \ln(10) = v_{\max} * 2,3$.

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 intermedios).

La **ventaja** de los ensayos de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento es la flexibilidad: cuando se determina en unas condiciones de tiempo y temperatura determinadas, se puede estimar la velocidad de crecimiento en otras condiciones de tiempo/temperatura sin tener que llevar a cabo otro ensayo de desafío, puesto que se conocen los valores cardinales de la cepa estudiada.



Estudios complementarios

El inconveniente, es la falta de consideración a los efectos de la fase de latencia, que pueden conducir a una concentración de L_m estimada diferente, dependiendo de si se tiene en cuenta o no. Probablemente, el ejemplo más extremo lo conforman los alimentos procesados a alta presión (HPP), en los que siempre existe una fase de latencia larga, pero en los que existe un crecimiento exponencial igual de largo, como si los alimentos no hubieran recibido tratamiento térmico. 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 para 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 (V_{max}).

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



Bibliografía

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: <https://www.anses.fr/fr/system/files/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. 29.4.2010) Versión consolidada disponible en castellano en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02005R2073-20190228>

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

Calculadora desarrollada por la Red BIOQURA: <https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>

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: https://food.ec.europa.eu/safety/biological-safety/food-hygiene/guidance-platform_en

Codex Alimentarius, 2004. Directrices generales sobre muestreo. CAC/GL 50-2004. Disponible en castellano. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B50-2004%252FCXG_050s.pdf

Documento técnico sobre estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Versión 4 del 1 de julio de 2021 (EURL. Lm Guide): <https://eurl-listeria.anses.fr/en/minisite/listeria-monocytogenes/mandate>

Documento técnico sobre estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Versión 4 del 1 de julio de 2021 (EURL. Lm Guide), en español : chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/DOCUMENTO_ORIENTACION_TECNICA_EURL_LISTERIA_ALC_2021.pdf

Documento para evaluación de la competencia de laboratorios que realizan test de desafío en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Versión 3 – 10 de febrero de 2023 (EURL Lm Guidance): <https://eurl-listeria.anses.fr/en/minisite/listeria-monocytogenes/mandate>

Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo de la AESAN (Aprobado en la Comisión Institucional de 16/10/2019): https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2019/verificacion_vida_util.htm

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: <https://www.combase.cc/index.php/en/>

Pathogen Modelling Programme. Departamento de Agricultura (USDA), Estados Unidos. Disponible en inglés en: <https://portal.errc.ars.usda.gov/>

Sym´previus: <https://symprevius.eu/en>

Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP). Disponible en: <http://fssp.food.dtu.dk/windowsdownload.aspx>

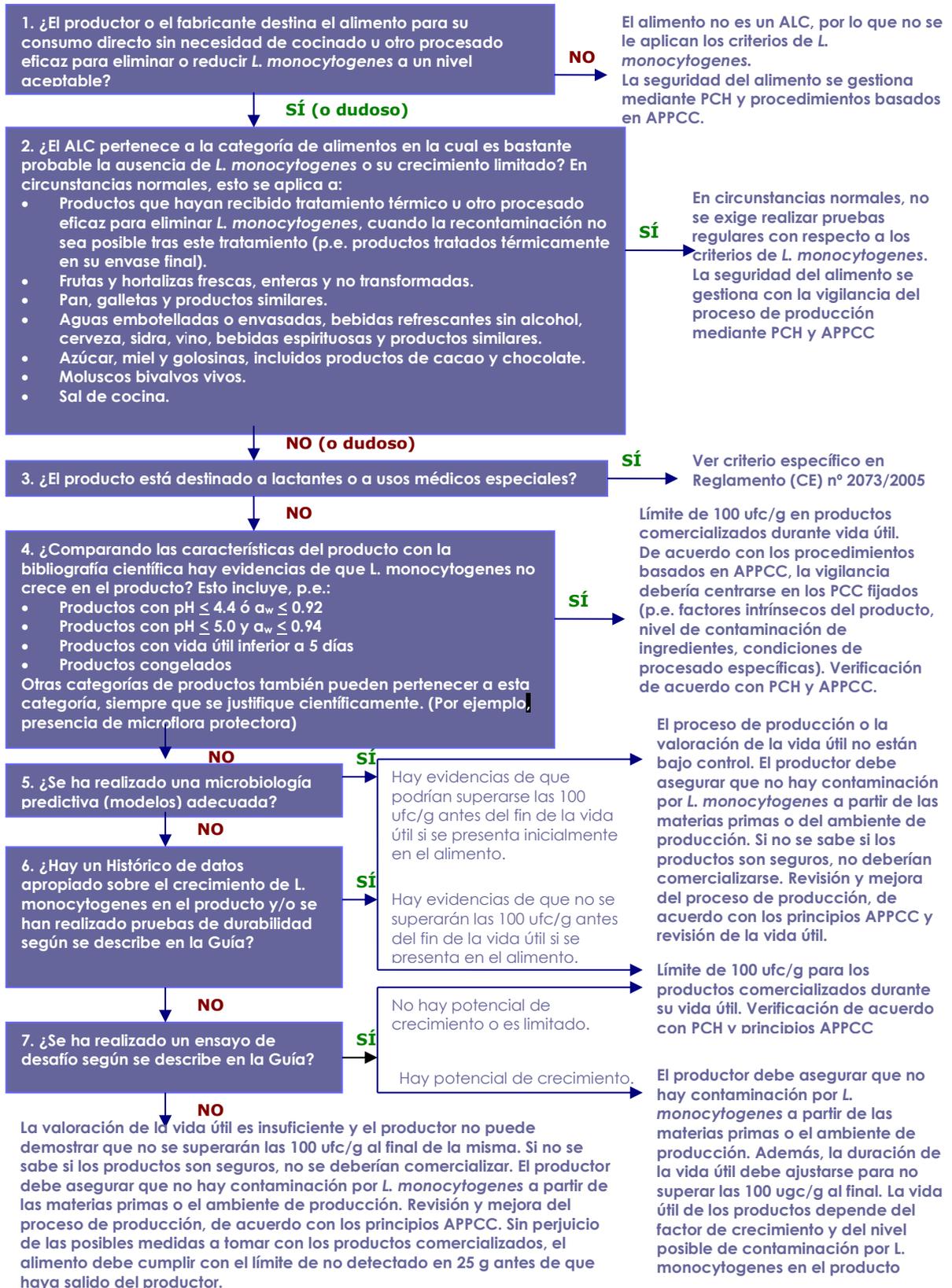
Ratkowsky et al., 1982. Relationship between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures. Journal of Bacteriology, Jan. 1982, p. 1-5

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, los 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,
- 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* (no detectado 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) nº 2073/2005, los siguientes productos se podrían incluir directamente en este grupo:

- Productos con pH < 4.4 ó aw < 0.92
- Productos con pH < 5.0 y aw < 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 aw 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 no detectado en 25 g antes de que el producto salga del productor.

Nota: para un estudio más exhaustivo y aplicación, consultar los ejemplos propuestos en el Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo de la AESAN (Aprobado en la Comisión Institucional de 16/10/2019)



Anexo 2. Beneficios/limitaciones de los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento, la velocidad máxima de crecimiento y de los estudios de durabilidad.

Tipo de estudio	Beneficios	Limitaciones
Ensayo de desafío/ potencial de crecimiento (Δ)	<p>Herramienta útil para validar la vida útil</p> <p>Cálculo de Δ a partir del uso de una fórmula simple</p> <p>El valor de Δ permite determinar si un ALC favorece o no el crecimiento de <i>Lm</i></p> <p>En estos experimentos se necesitan menos unidades de ensayo que para la velocidad máxima de crecimiento</p>	<p>Resultados limitados a las condiciones aplicadas en el estudio. No se puede extrapolar.</p> <p>Se necesita información sobre el perfil de tiempo/temperatura para recrear las condiciones de almacenamiento esperables del ALC</p> <p>Se necesitan incubadoras para reproducir con precisión el perfil de temperatura definido</p>
Ensayos de desafío y velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$)	<p>Herramienta útil para validar la vida útil</p> <p>Es posible extrapolar el resultado a otras condiciones</p> <p>Experimento realizado a una temperatura constante elegida por el laboratorio</p> <p>Ganancia de tiempo para evaluar una larga vida útil</p> <p>El uso de $\mu_{\text{máx.}}$ en modelos de microbiología predictiva permite estimar el nivel de contaminación de <i>Lm</i> en varias condiciones ambientales</p>	<p>Se necesitan conocimientos en microbiología predictiva y uso de <i>software</i> microbiológico predictivo</p> <p>Es preciso realizar más experimentos a intervalos cronometrados, por lo que no se necesitan más unidades de ensayo.</p> <p>Las cepas se analizan de manera individual.</p> <p>Cuando no se considere fase de latencia, en dichos estudios se puede sobrestimar la concentración de <i>Lm</i> en el producto analizado.</p>
Estudios de durabilidad	<p>Herramienta útil para validar la vida útil establecida</p> <p>Fácil de implantar en el laboratorio, no se necesita equipo específico</p> <p>No hay sesgo en cuanto al estado fisiológico de las bacterias en los alimentos debido a la contaminación natural</p> <p>Es posible recopilar estudios de durabilidad para incrementar el nivel de confianza en la vida útil establecida.</p>	<p>No es adecuado por sí solo para validar la vida útil microbiológica de los ALC</p> <p>No es posible probar todas las condiciones de almacenamiento previsible</p> <p>No es posible extrapolar los resultados a otras condiciones</p> <p>Se necesita información sobre el perfil de tiempo/temperatura para recrear las condiciones de almacenamiento esperables del ALC</p> <p>Se necesita conseguir un número importante de resultados para mayor confianza en la interpretación estadística</p>



Anexo 3. Ejemplos del uso de microbiología predictiva

Ejemplos de modelos de límites o interfase de crecimiento

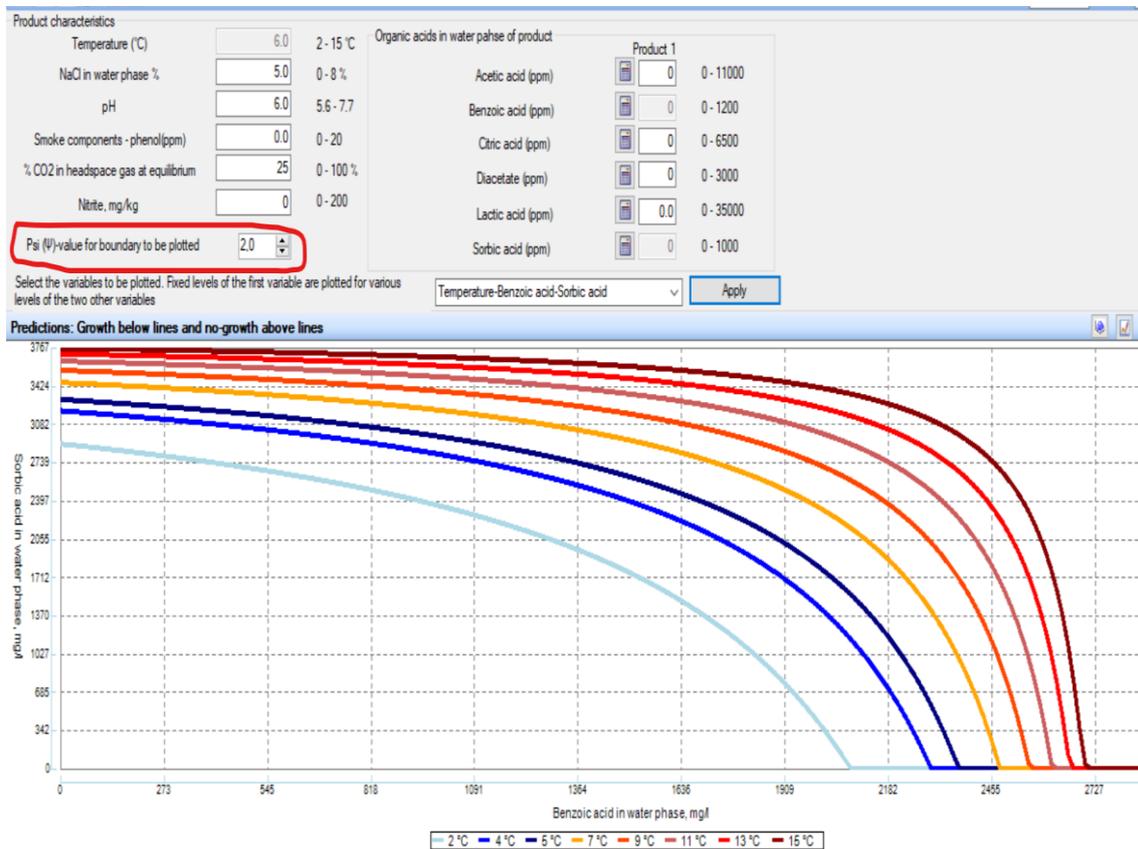
Symprevius

Efecto de distintas combinaciones de pH y aw en la probabilidad de crecimiento de *Lm* en frutas cortadas listas para el consumo mantenidas a 6°C



FSSP

Combinaciones de concentraciones de ácido sórbico y benzoico para prevenir el crecimiento de *Lm* en gambas peladas cocinadas mantenidas a distintas temperaturas, utilizando un margen de seguridad (Psi=2)



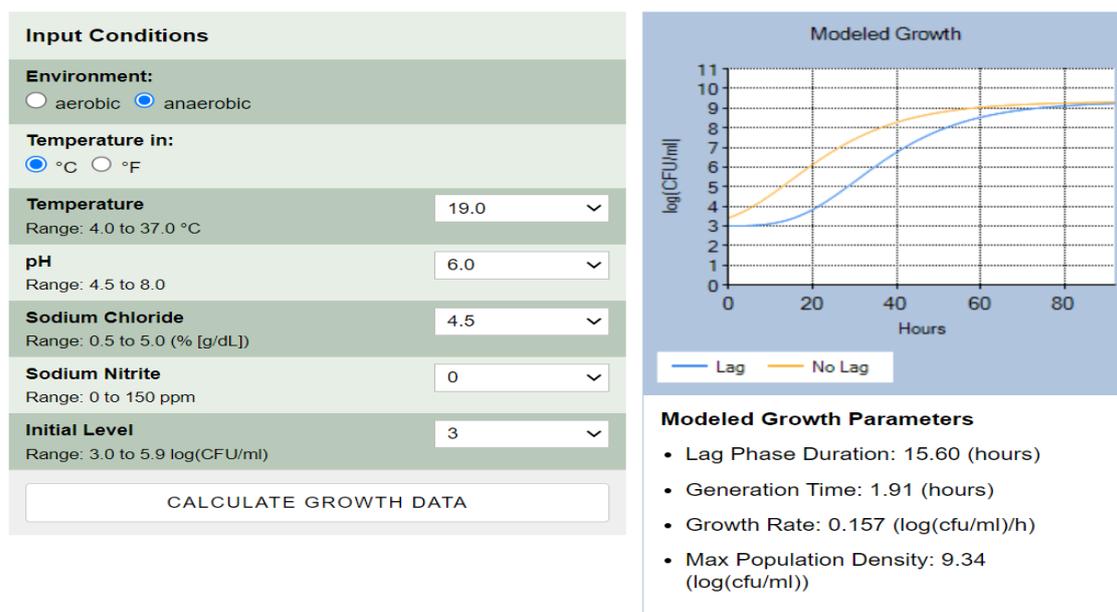
Anexo 3.

Ejemplos de modelos de simulación de crecimiento

PMP

Influencia de la temperatura, pH, concentración de NaCl y nitritos en el crecimiento de *Lm* en condiciones de anaerobiosis

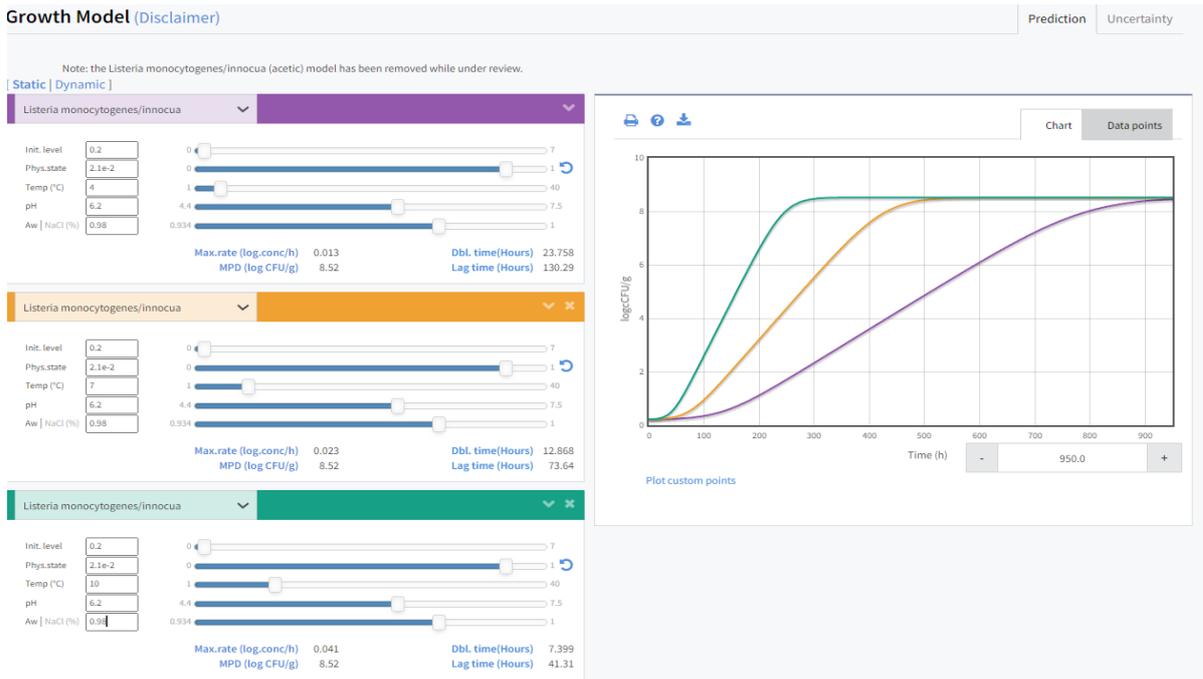
Growth Model: *Listeria monocytogenes* (Broth Culture, Anaerobic)



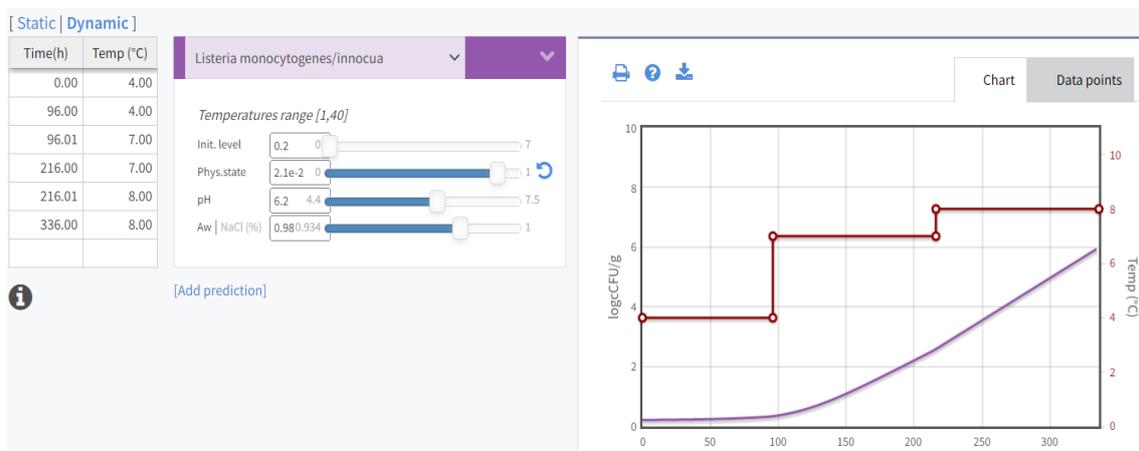
Anexo 3.

ComBase predictor

Influencia de la temperatura en la fase de latencia y tasa máxima de crecimiento de *Lm* (a menor temperatura mayor fase de latencia y menor tasa de crecimiento (Max.rate))



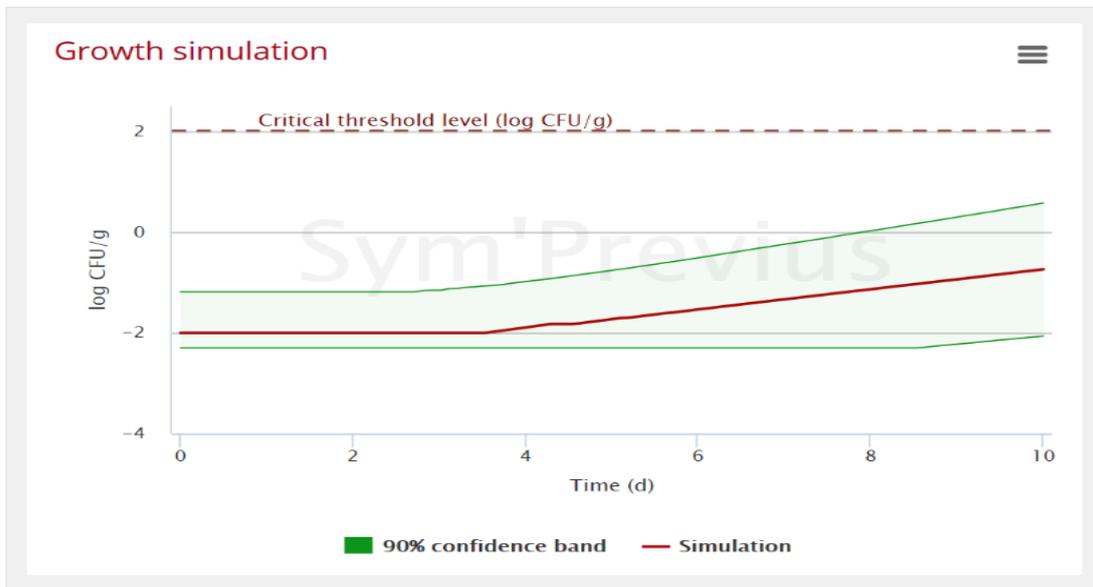
Crecimiento de *Lm* en condiciones dinámicas de temperatura (Línea roja temperatura, línea azul curva de crecimiento)



Anexo 3.

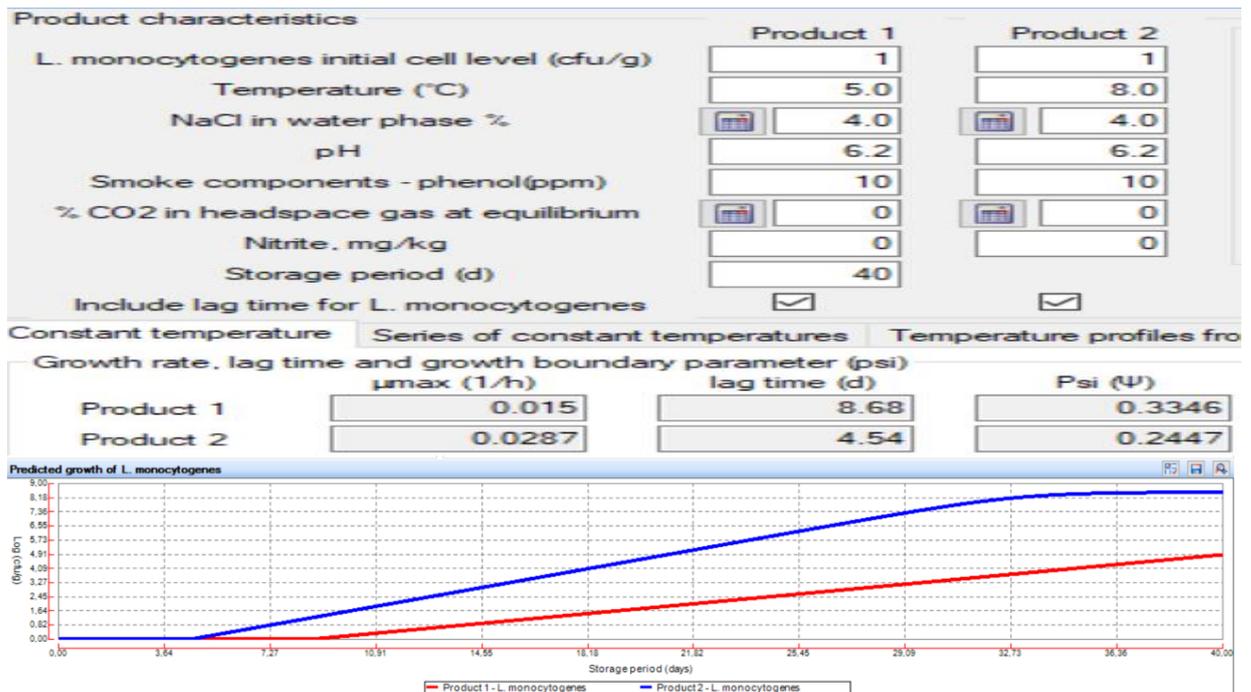
Sym´Previus

Ejemplo de simulación de crecimiento



FSSP:

Efecto de la temperatura en el crecimiento de Lm (tasa máxima de crecimiento y teniendo en cuenta la fase de latencia)



Anexo 4. Protocolo de estudios de durabilidad.

1) Muestreo

Se pueden realizar dos procedimientos de muestreo de alimentos: Muestreo aleatorio único o muestreo dirigido.

- Muestreo aleatorio único:

Este método de muestreo se aplica a ALC que favorezcan el crecimiento de Lm y que suelen contaminarse con niveles bajos de Lm. El muestreo debe repetirse para los diferentes lotes a lo largo del tiempo (mismo producto, mismo proceso productivo) para obtener datos suficientes con el fin de dar mayor fiabilidad al resultado obtenido.

- Muestreo dirigido:

Este método de muestreo se aplica a ALC en los que se detecte la contaminación inesperada (accidental) de un lote con Lm antes de que llegue al mercado. En este caso, se recomienda tomar el mayor número de muestras posible del lote contaminado, en el momento más cercano posible a la fecha de producción.

En el caso del muestreo aleatorio único, 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(figura 8). Este método de muestreo debería repetirse para diferentes lotes o días de producción (mismo producto, elaborado en condiciones similares) para obtener datos representativos.

Secuencia (min)	Números aleatorios	Secuencia (min)	Números aleatorios
2	0,794906986	120	0,003585898
3	0,645784585	50	0,013601726
4	0,656818771	65	0,062019673
5	0,687480458	85	0,063602709
6	0,216109446	45	0,150601224
7	0,916029238	20	0,216109446
8	0,865152538	35	0,236245046
9	0,236245046	40	0,264314978
10	0,264314978	60	0,266345684
11	0,150601224	95	0,285550545
12	0,013601726	90	0,295170393
13	0,490491758	115	0,328738489
14	0,266345684	105	0,328771115
15	0,062019673	70	0,334386325
16	0,334386325	80	0,385249527
17	0,414018233	135	0,387208824
18	0,385249527	75	0,414018233
19	0,063602709	55	0,490491758
20	0,295170393	5	0,645784585
21	0,285550545	150	0,651923377
22	0,783902987	10	0,656818771
23	0,328771115	15	0,687480458
24	0,852191875	125	0,714912002
25	0,328738489	145	0,77206704
26	0,003585898	100	0,783902987
27	0,714912002	0	0,794906986
28	0,990564648	110	0,852191875
29	0,387208824	30	0,865152538
30	0,989365375	25	0,916029238
31	0,77206704	140	0,989365375
32	0,651923377	130	0,990564648

Figura 2. Ejemplo de un muestreo aleatorio a partir de un libro de cálculo Excel



Anexo 4

2) Condiciones de conservación

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(s) temperatura(s) y duración se deben seleccionar dependiendo de la información disponible, y deben estar debidamente justificados y documentados por el operador de empresa alimentaria:

- En la primera fase de la cadena de frío (desde fabricación hasta la llegada al expositor), cuando los operadores de empresas alimentarias disponen de sus propios datos, se prefiere el uso de esta información. En este caso, se utilizará el percentil 95 de la observación de datos de los operadores de empresas alimentarias. En el caso de no disponer de datos, se utilizará la temperatura por defecto que figura en la Tabla 3.
- En la segunda fase (expositor en tienda) y en la tercera fase (almacenamiento por parte del consumidor) de la cadena de frío, en los casos en los que se disponga de información, se prefiere el uso de datos nacionales donde se encuentra la fase de la cadena de frío. En este caso, se utilizará el percentil 95 de la observación de datos. En el caso de no disponer de datos, se utilizará la temperatura por defecto que figura en la Tabla 3.

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

Etapa de la cadena	Tª 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	7º 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	7º 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	10 º 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 95 de los datos obtenidos por el fabricante

** Temperatura justificada por información detallada: el percentil 95 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 UFC *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.



Anexo 4

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 o incluso inferior, con el fin de ser capaz de cuantificar con precisión el nivel de contaminación por *L. monocytogenes* al final de periodo de conservación.

a/ Para ALC que favorezcan el crecimiento de *Lm* y que suelen contaminarse con niveles bajos de *Lm*: Al final de la vida útil, se realizan análisis cuantitativos de todas las unidades almacenadas en condiciones razonablemente previsibles para evaluar si se supera o no el valor de 100 *Lm*/g o ml al final de la vida útil.

b/ Para ALC en los que el lote se contamine de manera inesperada (accidental) con *Lm*: Al menos, se realizan análisis al principio (lo más cercano posible a la fecha de producción) y al final de la vida útil. Cuando resulte factible, se recomienda llevar a cabo análisis en fechas intermedias para recopilar información sobre el comportamiento de *Lm* en el alimento.

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 “ $n=5, c=0; m=M \leq 100$ ufc/g en el momento del consumo”. No obstante, el estudio de durabilidad no tiene como finalidad comprobar la aptitud para el consumo de un lote de alimentos y por tanto, estos controles no entran en el alcance de esta Guía.

La interpretación de los estudios de durabilidad, los cuales consisten en demostrar 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, que debe ser lo más bajo posible) 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 estimar con un intervalo de confianza (IC) del 95% la proporción de unidades que superan las 100 ufc/g en toda la población del lote, puede utilizarse la calculadora [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 pueden diferir ligeramente, pero son de una magnitud del mismo orden. Se recomienda utilizar el intervalo central de confianza. Se puede utilizar también la calculadora de la red BIOQURA: <https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>

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% de
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%]

Cuantas 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 (0-7%) que el obtenido para “0 de 20 (0-16%) unidades que superen las 100 ufc/g”.



Anexo 4

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

El laboratorio deberá incluir al menos la siguiente información:

- ✓ ALC analizado (identificación, composición, vida útil, características fisicoquímicas y microbiológicas, proceso de producción, envasado...);
- ✓ Muestreo de alimentos (identificación del lote / lotes estudiado/s, fechas del muestreo, método utilizado, número de muestras analizadas);
- ✓ Condiciones de almacenamiento (perfil de tiempo/temperatura, registro de temperatura durante todo el estudio);
- ✓ Análisis microbiológicos (métodos analíticos, fecha(s) de análisis y número de unidades/fecha(s));
- ✓ Resultados obtenidos en el lote analizado (número de unidades analizadas, número de unidades que superen 100 ufc/g, proporción observada y estimada (IC del 95 %) de unidades por encima de 100 ufc/g en el alimento analizado).

El aprovechamiento de los datos (es decir, la aplicación de los resultados), no entra dentro del alcance del informe de ensayo, sino que debe formar parte del informe de estudio de vida útil que preparen los operadores de empresas alimentarias

Nota: para un estudio más exhaustivo y aplicación, consultar el protocolo y los ejemplos propuestos en el documento en vigor EURL Lm Technical Guidance Document.



Anexo 5. Ensayos de desafío: Prerrequisitos antes de iniciar un ensayo de desafío

Antes de iniciar un ensayo de desafío, el operador de empresa debe poder facilitar al laboratorio la información relevante sobre las características del producto estudiado.

Caracterizar el producto permitirá:

- Identificar los factores que puedan tener un impacto en el crecimiento de *L. monocytogenes* y priorizar su medición;
- Evaluar las fuentes de variabilidad de los factores que caracterizan el producto y el proceso productivo;
- Demostrar que los productos analizados durante los ensayos de desafío son representativos de la producción.

El fabricante debe proporcionar al laboratorio toda la información relevante sobre el alimento, para ayudarle a diseñar las condiciones del estudio, entre ellas:

- Descripción del alimento (denominación, si es nueva formulación o producto con un historial de producción)
- Lista de ingredientes
- Fecha de caducidad
- Histórico del producto: si es producto nuevo o nueva fórmula o producto ya comercializado
- Características físico-químicas del producto; parámetros de interés (incluyendo la media, la desviación estándar y el intervalo) pH, a_w y salinidad, y opcionalmente: contenido de sal y conservantes. Es importante tener en cuenta que algunas características pueden cambiar a lo largo de la vida útil del alimento (por ejemplo, pH en productos fermentados, quesos, o valores a_w en jamón curado o quesos duros)
- Condiciones de envasado del producto final (al vacío, en atmósfera protectora, tipo de envase y permeabilidad, etc)
- Principales etapas del proceso productivo especialmente fases relacionadas con la inactivación de microorganismos (tratamiento térmico, secado, ahumado, maduración, congelación, salado) o en las que se pueda producir recontaminación (ejemplo adición de materias primas crudas, descongelación, loncheado después del tratamiento térmico sin tratamiento bactericida posterior o envasado)
- Caracterización de la cadena del frío (datos de los que disponga el fabricante) Si los datos sobre las temperaturas y duración de almacenamiento no están disponibles, el laboratorio tendrá que emplear los valores por defecto que se especifican en el Documento de orientación Técnica del LRUE para *Lm*)
- Vida útil, condiciones recomendadas (instrucciones de uso en el envase) y condiciones razonablemente previsibles de uso del producto.

Para caracterizar el producto, se recomienda estimar la variabilidad intralote en un mínimo de cinco valores y la variabilidad interlote en un mínimo de tres lotes diferentes analizados en un periodo en el que se refleje la posible variabilidad. Este número mínimo de datos se tendrá en cuenta como punto de partida para caracterizar la variabilidad de los factores que repercuten en el crecimiento de *Lm*.



Anexo 6. Protocolo de los ensayos de desafío para el potencial de crecimiento

1) Elección y número de lotes

Por norma se examinarán **al menos tres lotes** para tener en cuenta la variabilidad interlote.

Para contabilizar la variación del proceso de producción y del producto, se recomienda analizar tres lotes producidos en tres días diferentes. Si se producen diferentes lotes en un mismo día, y la variabilidad entre lotes se cubre en un día (lo cual deberá justificarse), podrá aceptarse que se analicen tres lotes producidos en el mismo día.

Los lotes deben enviarse al laboratorio a la mayor brevedad posible tras la producción (es decir, el día de producción o el siguiente) para evitar que se alteren las características alimentarias entre el día de producción y el día de inoculación.

2) Elección de la cepa a inocular

Hay que utilizar una mezcla de **al menos dos cepas** para tener en cuenta la variabilidad de crecimiento entre las distintas cepas de *Listeria monocytogenes* en un alimento se utilizarán las mismas cepas en los tres lotes analizados. El crecimiento de las cepas de *Lm*, varía en función del alimento y de las condiciones de almacenamiento. Para ayudar a los laboratorios en la elección de las cepas de *L. monocytogenes*, el EURL *Lm* ha constituido una colección de cepas de *L.monocytogenes* aisladas de diferentes orígenes (carne, pescado, productos lácteos y entorno). Estas cepas se han caracterizado según sus habilidades de crecimiento (la velocidad máxima de crecimiento calculada a pH, aw y Temperaturas extremos). La colección de cepas del EURL *L.m* está disponible para los laboratorios nacionales de referencia. Las cepas deben almacenarse en el laboratorio en condiciones que minimicen o eliminen las mutaciones que puedan afectar sus características de crecimiento o supervivencia.

3) Preparación del inóculo

Las cepas que se utilicen en el test, deben estar en el mismo estado fisiológico que aquellas que pueden contaminar el alimento en condiciones naturales, es decir en la fase estacionaria de crecimiento. Para ello se sigue el siguiente protocolo:

.- 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 (30-37^a C) favorable para el crecimiento óptimo de *L. monocytogenes*, durante el tiempo suficiente (8-16 horas) para que todas las células alcancen la fase estacionaria de crecimiento (alrededor de 9,20 log₁₀ ufc/ml); este primer subcultivo tiene por objeto conseguir que todas las células alcancen el mismo estado fisiológico.

.- Después se prepara un segundo subcultivo en el mismo medio y se incuba a una temperatura cercana a la temperatura habitual de almacenamiento del producto (en productos listos para el consumo, habitualmente almacenados a refrigeración, deben utilizarse 8°C durante 4 días ó 10°C durante 3 días)) con el fin de que la cepa se adapte a estas condiciones de conservación, y, para permitir el crecimiento de las cepas hasta la fase exponencial tardía o fase estacionaria temprana alrededor de 9,20 log₁₀ ufc/ml).



Anexo 6

.-Posteriormente se deben mezclar en cantidades iguales los cultivos bacterianos de cada una de las cepas que conforman el cóctel. De este cultivo mixto se hacen diluciones sucesivas en suero fisiológico, a la misma temperatura a la que se ha incubado el segundo subcultivo (7-10°C). Para obtener un inóculo con una concentración similar a la que puede contaminar el alimento de forma natural, se recomienda 100ufc/g (rango de 50 a 200ufc/g), ya que, si la concentración es demasiado alta, se sobrecargan los posibles sistemas inhibitorios del alimento, y si es demasiado baja, el test dará un falso resultado negativo, porque las células no lograrán multiplicarse. Este inóculo se debe utilizar inmediatamente.

.-Finalmente, **se comprueba la concentración del inóculo** mediante recuento en agar selectivo.

4) Preparación e inoculación de las unidades de prueba

Número de unidades y número de puntos de muestreo

De acuerdo con la norma EN ISO 20976-1, el número de unidades que deben prepararse por cada lote (unidades de ensayo a inocular, unidades de control y muestras de control alimentario), y el número de puntos de muestreo, se recogen en la tabla 5

Se requiere muestreo destructivo para los análisis microbiológicos durante todo el ensayo. Los puntos de análisis intermedios permiten tener en cuenta la variación de las propiedades del alimento a lo largo de la vida útil, y los posibles picos en el recuento de la bacteria durante la vida útil (crecimiento muy rápido seguido de una disminución rápida), que son normales al principio de la vida útil. Para determinación de las características físico-químicas, atmósfera gaseosa y recuento de microflora asociada, se pueden utilizar las mismas unidades de prueba.

Tabla 5. Número de unidades a preparar productos envasados al aire, vacío o atmósfera modificada por lote

Tipo de unidades	Tipo de análisis	Nº de unidades y fecha de análisis por lote	
Unidades de ensayo	Recuento <i>L. monocytogenes</i>	7	3 en $t_0 + 1$ (unidad de ensayo X 3 fechas intermedias) + 1 en t_{final}
Muestras de control alimentario	Detección <i>L. monocytogenes</i>	1	1 en t_0
	Medición características físicoquímicas	2 (si envasado en atmósfera modificada)	1 en t_0
	Recuento de la microbiota asociada		1 en t_0
	Medición EAM		1 en $t_0 + 1$ en t_{final}
Unidades de control	Medición características físicoquímicas	2	1 en $t_0 + 1$ en t_{final}
	Recuento de la microbiota asociada		
	Medición EAM		
	Control de temperatura	1	Durante todo el ensayo
Número total de unidades		11 (env al aire o vacío) , 12 EAM	

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



Anexo 6

Procedimiento de inoculación

Esta etapa es crítica cuando se hace un ensayo de desafío, para que no se alteren las propiedades intrínsecas del alimento. Para minimizar cambios en las características físico-químicas, el volumen de inóculo nunca debe superar el 1% de la masa (o

volumen) de la unidad de test, para no alterar significativamente las características intrínsecas del alimento y por tanto las características de crecimiento del inóculo. Se pueden utilizar distintos métodos de inoculación, dependiendo del tipo de alimento.

Los métodos de inoculación recomendados son:

- ✓ Bien el alimento se retira de su envase, se inocula y se vuelve a envasar en condiciones similares; en cuyo caso la inoculación puede realizarse
 - en profundidad, en alimentos considerados homogéneos (por ejemplo, alimentos homogeneizados después de triturarse) o preparados mezclando varios materiales (por ejemplo, ensaladas mixtas),
 - en superficie, para simular la contaminación de una parte específica durante el procesado (por ejemplo, productos contaminados durante el loncheado o envasado).
Para productos con múltiples componentes o capas, se deben inocular los componentes más relevantes en relación con una posible contaminación por *L. monocytogenes* y/o las interfases entre ellos (ejemplo: sándwich)

- ✓ Bien el alimento se mantiene en su envase y se inocula por medio de un septo que se cubre inmediatamente con un segundo septo, para mantener las condiciones atmosféricas del envase.

Debe tenerse cuidado para asegurar que el espacio de cabeza y la composición gaseosa de las unidades de test sean lo más parecidas posible a las del producto comercial.

Nivel de contaminación

El nivel de contaminación debe ser alrededor de 100 ufc/g (2 Log ufc/g). Esto reducirá el efecto de la incertidumbre de medida asociada a cifras bajas. En productos fermentados, puede utilizarse un nivel de contaminación mayor, para seguir con facilidad el crecimiento de las cepas de *Lm* entre otros microorganismos.

La desviación estándar ($DE = \sqrt{\sum |x - \mu|^2 / N}$ donde \sum significa "suma de", x es un valor de un conjunto de datos, μ es la media del conjunto de datos y N es el número de datos) del recuento de *Lm* obtenida en el día 0 (el día de inoculación) de las tres réplicas debe calcularse y debe ser inferior a 0,3 log ufc/g. En el supuesto de que esta desviación estándar fuese superior, no se aceptará el ensayo de desafío para el lote analizado y será preciso realizar un nuevo ensayo de desafío en otro lote.



Anexo 6

Detección de *L. monocytogenes* el día 0

En las muestras de control alimentario utilizadas para detectar *L. monocytogenes* no se añadirá suero fisiológico. Si se detecta *L. monocytogenes* en estas unidades de test, el resultado del ensayo de desafío no es válido.

Medición de los parámetros fisicoquímicos

Es fundamental conocer el pH y la aw del producto. En lugar de la aw, pueden utilizarse el contenido en NaCl y la humedad o el contenido en materia seca, para aquellos productos en los que el NaCl sea el factor que controle la aw. Para calcular el contenido de la fase acuosa a partir del porcentaje de materia seca, el porcentaje de NaCl en el producto y para calcular la actividad en agua puede utilizarse la calculadora disponible en el *software* FSSP (Food Safety and Spoilage Predictor) (gratuita *online*)

Deberán medirse otros factores, como los ácidos orgánicos, en la medida en que sean relevantes para controlar el crecimiento de *Lm*

Para medir las propiedades fisicoquímicas del producto, se prefieren los métodos estandarizados (ISO, EN o normas nacionales). Estas mediciones deben compararse con los datos procedentes de la producción normal del alimento para demostrar que los lotes utilizados en el ensayo de desafío representan los procesos productivos normales y, preferentemente, que el lote que se utiliza en el ensayo de desafío representa el escenario menos favorable.

Cuando se midan las propiedades fisicoquímicas de un producto, debe analizarse una parte representativa del producto, teniendo en cuenta los lugares en los que se espera encontrar *Lm* en el producto. Por ejemplo, en el pescado ahumado, es más probable que *Lm* se encuentre en la superficie del producto que en su interior, y las características fisicoquímicas de la superficie cobran especial importancia, ya que pueden variar ligeramente respecto a las del interior del producto.

Medición de la atmósfera gaseosa

En relación con las unidades de ensayo que se hayan vuelto a envasar al vacío, es importante comprobar el funcionamiento de la máquina de vacío para obtener las mismas condiciones de vacío iniciales.

En relación con las unidades de ensayo que se hayan vuelto a envasar en atmósfera modificada, es importante utilizar las mismas condiciones de envasado en atmósfera modificada (EAM): composición gaseosa, relación gas/producto y permeabilidad gaseosa del material de envasado (propiedades de barrera similares).

En lo que respecta a unidades de ensayo envasadas en atmósfera modificada e inoculadas mediante un septo en el envase original, resulta importante comprobar la estanqueidad del envase durante el ensayo de desafío. La composición gaseosa debe medirse con un analizador de espacio de cabeza para garantizar que no se produzcan fugas en el envase durante el periodo de almacenamiento.



Anexo 6

Estos análisis deben realizarse al comienzo (t0) y al final (tfinal) del análisis, sobre una muestra de control de alimento (sin septo) y sobre una unidad de control (con septo), para comprobar la estanqueidad del envase durante todo el periodo de ensayo.

Medición de la temperatura

Las temperaturas de almacenamiento de las unidades de ensayo deben registrarse durante todo el ensayo, para ello se utiliza un registrador de datos térmicos en una

unidad de control, que se encuentre en la misma incubadora y lo más cerca posible de las unidades de ensayo restantes.

5) 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, las pruebas de inoculación **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	Tª 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	7º 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	7º 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	10º 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 95 de las observaciones del operador de empresa alimentaria

(**) Temperatura justificada por información detallada: el percentil 95 de las observaciones del país donde se localiza la etapa de la cadena del frío en consideración



Anexo 6

6) Análisis microbiológicos:

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 estén validados con respecto al de referencia, y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140-2 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.

Dado que las unidades de ensayo se contaminan de forma artificial con *Lm*, no es necesario completar el paso de confirmación cuando se realiza el recuento.

Cuando se detecta *Lm* en el control en el momento 0, es posible continuar el ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento del lote estudiado (por la inoculación de múltiples cepas bacterianas) únicamente si el nivel de contaminación natural por *Lm* es inferior o igual al nivel de inoculación, que debe situarse en el rango [50-200 ufc/g].

Puesto que el nivel diana de contaminación es de 100 ufc/g, el límite del recuento debe ser bajo, no mayor de 10 ufc/g, lo que se consigue, 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; o sembrando 1 placa grande de 140 mm de Ø, ó, si está validado, volcando 1 ml en 1 placa de 90 mm de Ø.

También se puede lograr un límite bajo de recuento usando filtración u otro método que esté validado y tenga un nivel de detección inferior.

Teniendo en cuenta el nivel de recuento (entre 50-200 ufc/g), para evitar niveles bajos (menos de 10 colonias en una placa de Petri) en los recuentos de colonia, se puede, o bien disminuir el factor de dilución de la suspensión inicial (ej: 1/5 en lugar de 1/10), o bien, aumentar el volumen de la suspensión de las placas (por ejemplo, 2 ml en 2 placas de 140 mm de Ø, o 2 ml en 6 placas de 90 mm de Ø).

c) **Microflora asociada**. Se puede tratar de aeróbios mesófilos (EN ISO 4833), o una microflora específica del alimento (p.e. bacterias ácido-lácticas, Pseudomonas, levaduras o mohos). Los métodos para su recuento deben seguir los correspondientes estándares CEN, ISO o nacionales, para el microorganismo y alimento implicados.



Anexo 6

7) Cálculo del potencial de crecimiento:

El potencial de crecimiento se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta = \log_{\max} - \log i$$

Donde \log_{\max} es el valor superior del recuento de *Lm* de, al menos, los cuatro puntos de muestreo (menos la muestra en T_0), si se analiza solo una unidad de ensayo por punto de muestreo. Si se analiza más de una unidad de ensayo por punto de muestreo, entonces \log_{\max} es el valor medio más alto obtenido en cada uno de los 4 puntos de muestreo.

$\log i$, es el valor medio de las tres unidades de ensayo analizadas en el momento 0 (T_0).

El potencial de crecimiento de todos los lotes analizados es el mayor Δ obtenido.

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". Si esta desviación estándar (debido a la incertidumbre de la medición y a la contaminación heterogénea) es igual o mayor que 0.3 log ufc/g, la prueba de inoculación no es aceptable.

Cuando una prueba de inoculación 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).

8) 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 asume que **el alimento no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes*.**
- **Si Δ es mayor que $0.5 \log_{10}$** , se asume que **el alimento sí favorece** el crecimiento de *L. monocytogenes*.

En los casos en que se asume 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 máxima = concentración inicial + Δ (la concentración máxima 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 máximo" excederá el límite de 100 ufc/g)
- concentración inicial = concentración máxima - 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 durante la vida útil).



Anexo 6

9) Informe de la prueba

Ver "LISTA DE COMPROBACIÓN PARA ENSAYOS DE DESAFÍO (POTENCIAL DE CRECIMIENTO Y TASA MÁXIMA DE CRECIMIENTO)" al final del Anexo 9

Es importante mencionar en el informe que, los resultados del estudio, son válidos solo para un alimento concreto en las condiciones de almacenamiento aplicadas, y, deberán repetirse, ante cualquier cambio en la formulación, el procesado o las condiciones de almacenamiento del alimento.

Deberá indicarse en el informe si el ensayo de desafío se realiza sobre un único producto o si es para un grupo de productos.

El aprovechamiento de los datos (es decir, la aplicación de los resultados), no entra dentro del alcance del informe de ensayo, sino que debe formar parte del informe de estudio de vida útil que preparen los operadores de empresas alimentarias.

Nota: para un estudio más exhaustivo y aplicación, consultar el protocolo y los ejemplos propuestos en el documento en vigor EURL Lm Technical Guidance Document



Anexo 6

EJEMPLOS DE CÁLCULO DEL POTENCIAL DE CRECIMIENTO

A continuación, se muestran ejemplos del cálculo del potencial de crecimiento a partir de ensayos de desafío, y de la aplicación de los resultados obtenidos.

En el primer ejemplo (tabla 7) se analizan tres lotes. Para cada lote cinco puntos de muestreo en total (T_0 y otros cuatro puntos), en cada punto de muestreo se analiza una unidad de prueba. Este ejemplo representa la mayoría de los casos.

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

Lotes	T_0		T_1	T_2	T_3	T_4	Δ Lote	Δ Alimento
	Log10 ufc/g	Media \pm de*	Log10 ufc/g	Log10 ufc/g	Log10 ufc/g	Log10 ufc/g		
1	2,15 2,18 2,08	2,14 \pm 0,05	2,15	2,11	2,04	2,18	2,18- 2,14 =0,04	0,08
2	2,11 2,15 2,04	2,10 \pm 0,06	2,18	2,10	2,11	2,08	2,18- 2,10 =0,08	
3	2,16 2,26 2,18	2,20 \pm 0,05	2,20	2,20	2,24	2,06	2,24- 2,20 =0,04	

En este primer ejemplo, las desviaciones estándar para los 3 resultados del "día 0" son 0,05 log₁₀ ufc/g para el lote 1; 0,06 log₁₀ ufc/g para el lote 2, y 0,05 log₁₀ ufc/g para el lote 3. La inoculación se ha hecho correctamente, ya que la "de" (desviación estándar) es <0,3 log₁₀. Por lo tanto, pueden usarse todos los resultados para calcular el potencial de crecimiento. La diferencia más alta obtenida en los tres lotes, entre la concentración máxima a lo largo del ensayo y la concentración inicial en T_0 es 0,08 log₁₀. Por tanto, el potencial de crecimiento de *Lm* en el alimento, es inferior a 0,5 log₁₀, por tanto, no favorece el crecimiento de *Lm*. En este caso, el Alimento Listo para el Consumo, puede clasificarse en la categoría 1.3 del Reglamento 2073/2005.

Conociendo el potencial de crecimiento, y la concentración inicial de *Lm* en el producto, podemos calcular la mayor concentración de *Lm* a lo largo de la vida útil del ALC. En este ejemplo concreto, suponiendo que la c_i es =1 log₁₀ ufc/g, la mayor concentración puede calcularse con la fórmula:

Mayor concentración $Lm = c_i + \Delta$

Mayor concentración = 1 log₁₀ ufc/g + 0,08 log₁₀ ufc/g = 1,08 log₁₀ ufc/g (menor de 2 log₁₀ ufc/g), el alimento no supera el límite del reglamento a lo largo de la vida útil prevista.



Anexo 6

En el segundo ejemplo, se presentan los resultados de un ensayo de desafío de tres lotes, con 4 puntos de muestreo, y 3 unidades de ensayo por punto de muestreo (debido a la variabilidad de los parámetros físico-químicos en el producto estudiado)

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

Lotes	T ₀		T ₁		T ₂		T ₃		T ₄		Δ Lote	Δ Alimento
	Log ₁₀ ufc/g	Medi a ± de	Log ₁₀ ufc/g	Medi a	Log ₁₀ ufc/g	Medi a	Log ₁₀ ufc/g	Medi a	Log ₁₀ ufc/g	Me dia		
1	2,10 2,28 1,80	2,06 ±0,2 4	2,90 1,98 3,10	2,66	3,00 3,86 3,95	3,60	4,12 4,24 4,18	4,18	4,9 8 4,7 5 4,7 3	4,8 2	4,82-2,06 =2,76	3,55
2	1,48 2,36 2,18	2,00 ±0,4 6										
3	2,16 2,26 2,18	2,20 ±0,0 5	1,80 3,00 3,10	2,63	3,28 3,85 3,70	3,61	4,30 4,35 4,80	4,48	5,5 0 5,8 5 5,9 0	5,7 5	5,75- 2,20=3,55	
4	2,20 2,04 1,96	2,06 ±0,1 2	2,28 2,72 2,85	2,62	3,10 3,30 3,55	3,32	3,25 4,00 3,11	3,45	4,4 2 4,1 8 4,5 0	4,3 6	4,36- 2,06=2,30	

En este segundo ejemplo, las desviaciones estándar para los 4 resultados del "día 0" son 0.24 log₁₀ ufc/g para el lote 1; 0.46 log₁₀ ufc/g para el lote 2, 0.05 log₁₀ ufc/g para el lote 3 y 0.12 log₁₀ ufc/g para el lote 4. Por lo tanto, los resultados del lote 2 no pueden utilizarse, porque la desviación estándar es > 0.3 log₁₀ ufc/g. La diferencia más alta obtenida en los tres lotes utilizados, entre la concentración máxima a lo largo del ensayo y la concentración inicial en T₀ (Δ) es 3,55 log₁₀ ufc/g, mucho mayor que 0,5 log₁₀ ufc/g., por tanto, el alimento, favorece el crecimiento de Lm, y pertenece a la categoría 1.2 del reglamento.

En este caso, para asegurar que no se excede el límite de 2 log₁₀ ufc/g al final de la vida útil prevista, la concentración inicial de Lm debería ser muy baja, según la fórmula:

$C_i = 2 \log_{10} \text{ ufc/g} - 3,55 \log_{10} \text{ ufc/g} = -1,55 \log_{10} \text{ ufc/g}$, que son 0,03 ufc/g lo que equivale a no detectar Lm en 33 gramos de producto*

* Este valor se obtiene de la fórmula $\text{ ufc/g} / x \text{ g} = 0,03 \text{ ufc/g}$, de donde $x = 33 \text{ g}$, lo que equivale a decir que no se detecta Lm en 33 gramos de producto.



Anexo 7. Protocolo de ensayos de desafío para la velocidad máxima de crecimiento

1) Número de lotes

Generalmente se examinarán **al menos tres lotes para poder captar la variabilidad interlote**. No obstante, a partir de la "calculadora de variabilidad fisicoquímica interlote", disponible en el siguiente enlace: <https://eurl-listeria.anses.fr/en/minisite/listeria-monocytogenes/mandate>, se pueden realizar ensayos de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento, utilizando un único lote si se cumplen las siguientes condiciones:

- El operador de empresas alimentarias puede ofrecer datos sobre los factores que caractericen un producto del lote (variabilidad intralote) y entre los lotes (variabilidad interlote: al menos, medias de pH y aw de tres lotes y 5 unidades /lote)
- Los parámetros fisicoquímicos, el pH y el aw son los factores principales que repercuten en el crecimiento de *Lm* en el producto, y
- La repercusión de la variabilidad interlote de dichos parámetros fisicoquímicos sobre el crecimiento de la *Lm* no sea relevante (según los resultados de la herramienta de cálculo).

A continuación, se muestra un ejemplo de aplicación de la calculadora variabilidad interlote: La conclusión sobre si el impacto de la variabilidad de pH y aw es significativo en el crecimiento de *Listeria* a la temperatura del estudio aparece en rojo: en este ejemplo, habrá que utilizar al menos tres lotes, ya que el impacto de la variabilidad del pH y aw es significativo en las condiciones de temperatura a las que se va a realizar el test.

The IBPCV (Inter-Batch Physico-Chemica Variability) calculator enables to test if the inter-batch variability linked to pH and a_w of a food is significant regarding the growth rate of a bacteria. Blue zones have to be filled in: pH and a_w mean values for each of at least 3 batches, minimum temperature of the laboratory test and cardinal values for the bacteria. Green zones (Formulas) are protected. Answer appears in red characters.

Food data						Bacteria			
Batch	pH	Measured a_w	If no measured a_w		a_w	Temperature	Cardinal values		
			NaCl	Moisture			X_{min}	X_{opt}	X_{max}
	mean per batch at D_{95}	mean per batch at D_{95}	% (g/100g) mean per batch at D_{95}	% mean per batch at D_{95}					
1	5.8	0.98			0.98				
2	5.6	0.98			0.98				
3	5.0	0.98			0.98				
4	5.1	0.98			0.98				
5	5.4	0.98			0.98				
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
Mean	6.18				0.980				
Standard deviation	0.32				0.000				

	X_{min}	X_{opt}	X_{max}
Temperature	-2.00	37	45
pH	4.3	7	9.6
a_w	0.92	0.99	1

Storage temperature of the laboratory test (°C): 5

Conclusion: **The impact of the variability of pH and aw is significant in the tested temperature conditions.**

Es importante resaltar que, el uso de la calculadora, está limitado a los ensayos de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento, (no se usará en los ensayos de desafío para potencial de crecimiento, que siempre requieren estudiar al menos tres lotes)



Anexo 7

2) Elección de cepa(s)

Se utiliza una única cepa por ensayo de desafío. Es importante elegir una cepa de la que se conozcan las características de crecimiento, y que sea adecuada para el

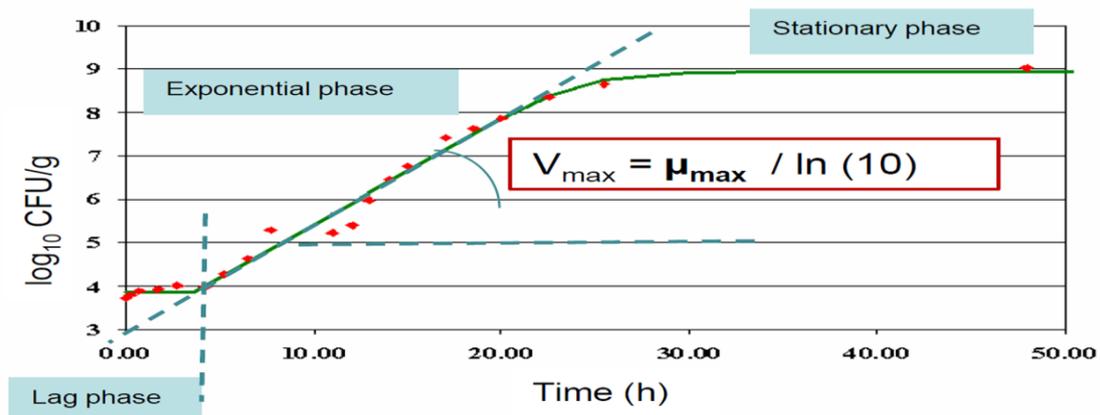
producto para el que se va a estudiar. La cepa puede elegirse entre el conjunto de cepas del EURL *Lm*, que están clasificadas en función de su velocidad máxima de crecimiento a bajas temperaturas, aw y pH. Se recomienda utilizar cepas que estén clasificadas en función de sus valores cardinales (T^a , pH y aw: mínima, óptima y máxima). Utilizar estas cepas permitirá predecir de forma más precisa el crecimiento de la cepa en el alimento estudiado en diferentes condiciones ambientales.

3) Preparación del inóculo

Los pasos para preparar el inóculo son los mismos que se han descrito en los ensayos de desafío para calcular el potencial de crecimiento, excepto que en este caso, la cepa se utiliza individualmente.

4) Preparación e inoculación de las unidades de prueba

Las fases de crecimiento bacteriano se ilustran en la siguiente figura (fase lag o de latencia, exponencial y estacionaria):



Las pruebas requieren un muestreo destructivo. Deberá haber, al menos, 8 puntos experimentales de muestreo por cada lote y curva de crecimiento, distribuidos a lo largo de todas las fases de crecimiento, (latencia, exponencial y estacionaria), con un mínimo de cinco puntos de muestreo en la fase exponencial.

Anexo 7

El **número de unidades por lote** se recoge en la siguiente tabla:

Tabla 9. Número de unidades a preparar por cada curva. Productos envasados.

Tipo de unidades	Tipo de análisis	Número de unidades y fecha de análisis por lote	
Unidades ensayo	de Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	11	3 en T ₀ y 8 para la curva de crecimiento con 5 en la fase exponencial
Muestras control alimentario	de Detección de <i>L. monocytogenes</i>	2	1 en t ₀
	Medición características fisicoquímicas		1 en t ₀
	Recuento microbiota asociada		1 en t ₀
	Medición de la EAM * (solo envasados en atmósfera modificada)		1 en T ₀ y 1 en T _{final} *
Unidades control	de Medición características fisicoquímicas	2	1 en T ₀ y a en T _{final}
	Recuento microbiota asociada		
	Medición de la EAM (solo envasados en atmósfera modificada)		
	Control de la temperatura		
Número total necesario por lote		16 (EAM), 15 (No EAM)	

Para la medición de las características físico-químicas, atmósfera gaseosa y determinación de la concentración de microflora asociada, se puede utilizar la misma unidad de test.

*Cuando se trate de productos envasados al aire o al vacío, no hará falta muestra de control alimentario para medir la atmósfera modificada al final del ensayo, y por este motivo solo hacen falta 15 unidades de ensayo por curva

- Preparación e inoculación de las unidades de prueba para determinar μ_{max}

Las condiciones para la preparación e inoculación de las unidades de prueba son las mismas que las descritas en los ensayos para calcular el potencial de crecimiento, excepto que en este caso, la inoculación se hace con una cepa (no una mezcla de ellas) para cada curva de crecimiento que se calcule. Las unidades de prueba deben inocularse lo más pronto posible desde el día de producción (salvo excepciones dentro de los dos días post-producción)

- Nivel de contaminación

El nivel de contaminación diana debería ser de unas 100 ufc/g y el volumen inoculado no debería sobrepasar el 1%(p/v) de la masa del producto

- Detección de *L. monocytogenes* en el alimento en muestras de control alimentario (no inoculadas) al principio y recuento al final ("día final")

Se prepara 1 **muestra de control alimentario por lote**, para verificar la ausencia de *L. monocytogenes* en el alimento, estas muestras no son inoculadas.

Si *L. monocytogenes* se detecta en las "muestras de control alimentario" en el "día 0", el ensayo de desafío no sería válido, ya que no se conocerían los números exactos al principio del estudio y no se podría calcular una velocidad de crecimiento correcta.

- Determinación de las características físico-químicas, microbiota asociada y atmósfera gaseosa iniciales ("día 0") y finales ("día final")



Anexo 7

Se prepara 1 muestra de control alimentario por lote para determinar las características físico-químicas, recuento de la microbiota asociada y atmósfera gaseosa (solo en productos envasados en atmósfera modificada) en el día cero, y solo para productos envasados en atmósfera modificada 1 muestra de control alimentario por lote para medir la atmósfera al final del ensayo: estas muestras no se inoculan y se puede utilizar la misma muestra que se utiliza para verificar la ausencia de *L. monocytogenes*

Se preparan 2 unidades de control para la medición de las características físico-químicas, recuento de la microbiota asociada y medición de la atmósfera gaseosa, 1 al inicio del ensayo y otra al final del mismo. Estas muestras no se inoculan con *L. monocytogenes*, 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)

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. Para las determinaciones físico-químicas y recuento de microflora asociada, se puede utilizar la misma unidad de muestra.

5) Condiciones de conservación del alimento inoculado

Este tipo de ensayos se llevan a cabo a una **temperatura fija de almacenamiento**, que debe oscilar entre los 6 y los 10 °C. En lo que respecta a los productos contaminados con bacterias del ácido láctico, la temperatura no debe superar los 8 °C para evitar que se inhiba el crecimiento por las bacterias del ácido láctico a temperaturas más elevadas.

El tiempo del ensayo debe ser lo suficientemente largo para trazar la curva de crecimiento y este tiempo puede ser más o menos corto que la vida útil estudiada.

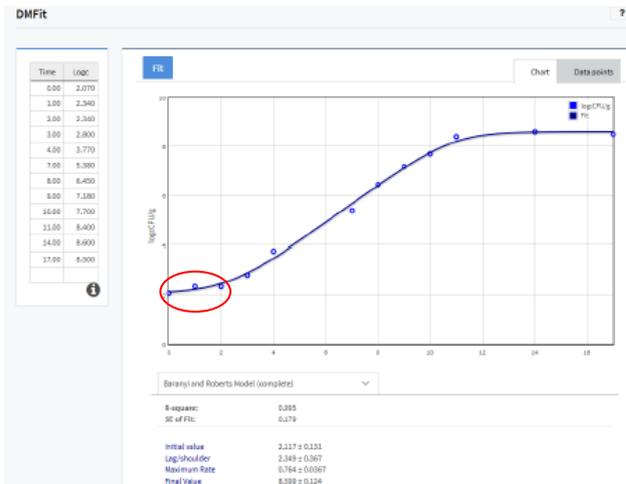
6) Cálculo de la velocidad máxima de crecimiento

Para cada curva de crecimiento (una curva de crecimiento por lote y cepa estudiada), la velocidad máxima de crecimiento puede estimarse ajustando un modelo primario (regresión no lineal) en todos los puntos experimentales de la curva de crecimiento. Este ajuste puede realizarse utilizando un software microbiológico predictivo gratuito, por ejemplo: DMFit del software ComBase (<https://www.combase.cc/index.php/en/>) o Ajuste de curvas de Sym'Previus (<https://symprevius.eu/en/>). Según el software utilizado, las unidades varían: en DMFit, si el dato de entrada es de log₁₀ ufc/g, la $V_{m\acute{a}x}$. se calcula en log₁₀ ufc/g y debe multiplicarse por 2,3 para obtener la $\mu_{m\acute{a}x}$. correspondiente. En Sym'Previus, el dato de entrada está en log₁₀ ufc/g y la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$.) se da y se expresa siempre en Ln ufc/g.



Anexo 7

La velocidad máxima de crecimiento estimada del producto analizado que se determine a partir del ensayo de desafío, es equivalente a la media (expresada con su desviación estándar) de los valores de velocidad máxima de crecimiento que se obtengan de las curvas de crecimiento (al menos una por lote). Para un ajuste adecuado del modelo primario con respecto de los puntos de datos experimentales, es importante disponer de un punto al comienzo de la fase estacionaria y otro posterior en la misma fase, como puede verse en la imagen:



Si el incremento de la población microbiana que se observa desde la curva de crecimiento es pequeño (< 1 log ufc/g), no se podrá determinar la $\mu_{\text{máx.}}$ de manera

fiable. En ese caso, se recomendaría trazar otra curva de crecimiento a mayor temperatura para el ajuste o realizar un estudio de potencial de crecimiento. En cualquier caso, si se tienen sospechas de que un producto no favorece el crecimiento de *Lm* dadas sus características fisicoquímicas, no se podrá estimar de manera fiable una velocidad máxima de crecimiento. En este caso, deberá realizarse un ensayo de potencial de crecimiento para demostrarlo.

Por último, es importante evaluar la incertidumbre sobre la tasa máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$) reflejada por el error estándar (se) o el intervalo de confianza (IC) sobre la estimación de la ($\mu_{\text{máx.}}$). Es importante que el error estándar no sobrepase el 20 % de la estimación de la $\mu_{\text{máx.}}$, ya que, en ese caso, la incertidumbre asociada a la $\mu_{\text{máx.}}$, es muy elevada, y el resultado debe interpretarse con cautela.

7) Explotación de resultados

Conocida la velocidad máxima de crecimiento a la temperatura del estudio, podemos evaluar el incremento en la población de *Listeria* durante la vida útil del alimento en las distintas temperaturas de almacenamiento.

A partir de la velocidad de crecimiento calculada en el estudio, expresada como μ_{max} o V_{max} , a la temperatura constante del estudio, podemos calcular la velocidad de crecimiento a otra temperatura utilizando la siguiente ecuación simplificada del modelo secundario de raíz cuadrada:

$$\text{Velocidad de crecimiento } T_0 = \text{Velocidad de crecimiento } T_c \times \frac{(T_0 - T_{\text{min}})^2}{T_c - T_{\text{min}})^2}$$



Con T_{\min} = temperatura mínima de crecimiento de *L. monocytogenes* = -2°C, puede utilizarse para todas las cepas como valor genérico

T_0 es la temperatura a la que queremos calcular la velocidad de crecimiento

T_c Es la temperatura a la que se ha calculado la velocidad de crecimiento en el estudio

Para aplicar esta fórmula, T_0 y T_c deben ser menores de 25°C, y, no es adecuada para productos con altos niveles de bacterias del ácido láctico. En este caso debe utilizarse un modelo más completo.

En consecuencia, asumiendo un modelo primario muy simple (sin tener en cuenta fase de latencia ni fase estacionaria):

- Incremento de L_m (en \log_{10}) durante un tiempo de almacenamiento d_1 (en días) a la temperatura T_c es igual a la Velocidad de crecimiento T_c (expresada en \log_{10} ufc/g por día) x d_1 .
- Incremento de L_m (en \log_{10}) durante un tiempo de almacenamiento d_2 (en días) es igual a la velocidad de crecimiento T_0 (expresada en \log_{10} ufc/g por día) x d_2 .

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

8) Informe de ensayo

Ver "LISTA DE COMPROBACIÓN PARA ENSAYOS DE DESAFÍO (POTENCIAL DE CRECIMIENTO Y TASA MÁXIMA DE CRECIMIENTO)" al final del Anexo 9

Los resultados del ensayo son específicos del producto analizado y la cepa utilizada en el estudio. Sin embargo, ofrecen datos útiles, que podrían utilizarse con ayuda de modelos de microbiología predictiva, para estimar los efectos de la variación de algunas características específicas del alimento (pH, a_w , conservantes, temperatura), en la tasa máxima de crecimiento.

El aprovechamiento de los datos (es decir, la aplicación de los resultados), no entra dentro del alcance del informe de ensayo, sino que debe formar parte del informe de estudio de vida útil que preparen los operadores de empresas alimentarias.

Nota: para un estudio más exhaustivo y aplicación, consultar el protocolo y los ejemplos propuestos en el documento en vigor EURL Lm Technical Guidance Document



Anexo 7

EJEMPLO DEL CÁLCULO DE LA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO

Ejemplo 1. Estimación del incremento en la población de Lm sin tener en cuenta el periodo de latencia

Datos:

- Vida útil = 9 días
- Condiciones de conservación: 4° C durante 3 días (d_1) y 8° C durante 6 días (d_2)

La prueba de inoculación se realizó a una $T_c = 8^\circ\text{C}$

La velocidad máxima de crecimiento (con su error estándar) a $8^\circ\text{C} = 0,764 \log_{10} \text{ ufc/g} \cdot \text{d}^{-1} \pm 0,0367$

Si dividimos el error estándar vinculado a la velocidad de crecimiento por su valor, obtenemos: $0,0367/0,764 = 4,8\%$. Se encuentra por debajo del umbral de incertidumbre del 20 % y genera confianza en que la estimación de la velocidad de crecimiento es precisa.

El modelo secundario permite predecir la velocidad de crecimiento a una $T_0 = 4^\circ\text{C}$ que será $= 0,764 \times (4 - (-2))^2 / (8 - (-2))^2 = 0,275 \log_{10} \text{ ufc/g} \cdot \text{d}^{-1}$

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

Crecimiento durante la vida útil =

$[(\text{Velocidad de crecimiento a } 4^\circ\text{C en } \log_{10} \text{ ufc/g por día}) \times d_1] + [(\text{Velocidad de crecimiento a } 8^\circ\text{C en } \log_{10} \text{ ufc/g por día}) \times d_2]$, donde

Crecimiento = $(0,275 \log_{10} \text{ ufc/g} \times 3 \text{ días}) + (0,764 \log_{10} \text{ ufc/g} \times 6 \text{ días}) = 5,42 \log_{10} \text{ ufc/g}$. Por tanto el alimento no cumpliría con el criterio establecido en el Reglamento 2073/2005 para *Listeria monocytogenes*: 100 ufc/g (2 log ufc/g) al final de la vida útil.

Este cálculo no incluye la fase de latencia ni la fase estacionaria (es decir, asume que todo el comportamiento simulado tiene un crecimiento exponencial durante toda la vida útil), y, por tanto, representa la hipótesis menos favorable.

Si se incluye el periodo de latencia en la estimación de la vida útil, hay que tener en cuenta que es difícil evaluar el estado fisiológico de Lm cuando se inocula en el producto

Ejemplo 2. Estimación del incremento de Lm calculando el periodo de latencia

Datos:

- Vida útil = 9 días
- Condiciones de conservación: 4° C durante 9 días

La prueba de inoculación se realizó a una $T_c = 8^\circ\text{C}$. A esta temperatura, se estimó un periodo de latencia de 2,35 días.

La relación (*latencia X velocidad de crecimiento* = h_0) (Baranyi y Roberts, 1994), se usa para calcular la constante h_0 , a partir de la cual se estimará el periodo de latencia a 4°C .

$$h_0 = 2,35 \times 0,76 = 1,79$$



Anexo 7

Latencia a 4°C = $h_0/\text{velocidad de crecimiento a } 4^\circ\text{C} = 1,79/0,275 = 6,5$ días, esto significa que el crecimiento no empezará hasta transcurridos 6,5 días a 4°C.

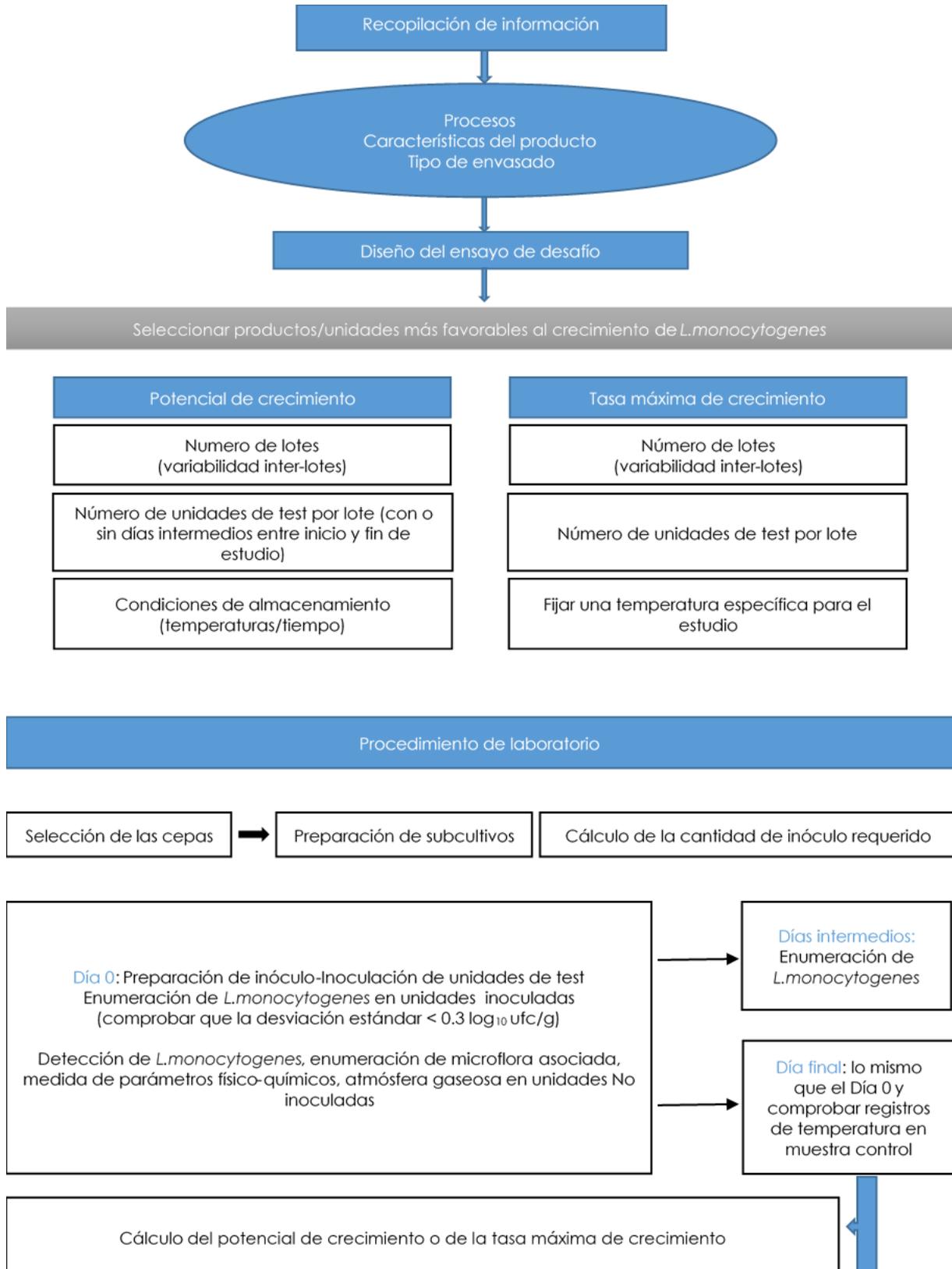
Al ser el periodo de vida útil previsto de 9 días, y, teniendo en cuenta que no se produce crecimiento durante los 6,5 primeros días, solo habrá crecimiento de Lm durante 9-6,5 días, es decir, durante 2,5 días a 4°C.

La estimación del crecimiento de Lm durante la vida útil será = $0 + (0,275 \times 2,5) = 0,69 \log_{10} \text{ ufc}$



Anexo 8

Diagrama-esquema para ensayos de desafío



Anexo 9. Listado de verificación de directrices técnicas

LISTA DE COMPROBACIÓN PARA ENSAYOS DE DESAFÍO (POTENCIAL DE CRECIMIENTO Y TASA MÁXIMA DE CRECIMIENTO)

Debe comprobarse que el diseño de los ensayos de desafío contemple los siguientes puntos, identificados tanto en la norma EN ISO 20976-1 como en el Documento de orientación técnica del laboratorio de referencia de la Unión Europea para *Listeria monocytogenes* (DT). Cualquier desviación de la lista de comprobación, debería añadirse como comentario en la columna derecha de la tabla.

Lotes	Especificaciones 20976-1 y DT	ISO	Si	No	Comentarios
Número de lotes analizados	Al menos tres lotes				
	Un lote para μ_{max} si la variabilidad interlotes de pH y Aw no tiene impacto en el ritmo de crecimiento de Lm				
	Uso de la calculadora de variabilidad interlotes				
Representatividad de los lotes	Los lotes representan la variabilidad normal del proceso de producción				
	Se ha elegido los lotes con características físico-químicas más favorables al crecimiento				
	Los lotes proceden de diferentes días de producción				
Uso de los lotes	Los lotes se analizan en tres días diferentes				
	El análisis se hace antes de transcurridos dos días desde la producción del lote				

Anexo 9

Cepas	Especificaciones 20976-1 y DT	ISO	Si	No	Comentarios
Número de cepas	Al menos dos cepas				
Selección de las cepas	Cepas de origen conocido				
	Cepas aisladas del alimento, del entorno de producción o de brotes				
	Cepas adecuadas al alimento y condiciones de almacenamiento estudiadas				
Utilización de las cepas	Cepas con características de crecimiento conocidas				
	Mezcladas (para estudios de potencial de crecimiento)				
Controles de las cepas (bioquímicos, de bioserotipado, crecimiento)	Por separado (estudios de tasa máxima de crecimiento)				
	Hay procedimientos de control				
	Se comprueban las características de crecimiento				
	Se han determinado los valores cardinales de crecimiento (para estudios de tasa máxima de crecimiento)				



Anexo 9

Preparación del inóculo	Especificaciones ISO 20976-1 y DT	Si	No	Comentarios
Preparación de los subcultivos	1er subcultivo en caldo, en condiciones óptimas de crecimiento hasta alcanzar la fase temprana de crecimiento estacionario			
	2o subcultivo a temperatura próxima a la del ensayo, hasta alcanzar la fase temprana de crecimiento estacionario			
	Se determina el nivel del inóculo en cada segundo subcultivo			
Mezcla de los subcultivos	Se hace a concentraciones iguales (solo ensayos Δ)			
Dilución de la mezcla (para ensayos Δ) o 2o subcultivo aislado (para ensayos μ)	En diluyente que no promueva el crecimiento (suero fisiológico)			
Uso del inóculo	Inmediatamente tras preparación			
	Cantidad suficiente para poder inocular todas las unidades de test			
Enumeración del inóculo	En el mismo medio (agar selectivo) utilizado para el test			
	Para inóculos "estresados" en agar selectivo y no selectivo			

Anexo 9

Inoculación de las unidades de test	Especificaciones ISO 20976-1 y DT	Si	No	Comentarios
Nivel inicial de contaminación	100 ufc/g (entre 5 y 200 ufc/g)			
Volumen del inóculo	El volumen del inóculo es ≤ 1% de la masa de la muestra inoculada			
Métodos de contaminación	Productos desenvasados			
	En profundidad			
	En superficie			
	En ambos			
	Productos multicomponentes			
	Contaminación de los componentes que mas probablemente estarían contaminados con Lm			
	Contaminación en las interfases			
	Reenvasado de productos contaminados artificialmente			
	En envase inicial o mismo material			
	Si otro material, propiedades conocidas similares al inicial			
	Misma composición gaseosa, mismo volumen y espacio de cabeza			
	Productos inoculados sin desenvasar			
	En superficie, profundidad o ambos, a través de un septum			
Uso de un doble septum				



Anexo 9

	Especificaciones ISO 20976-1 y DT	Si	No	Comentarios
Preparación de las unidades de control				
	Añaden volumen de suero fisiológico equivalente al volumen del inóculo			
	Hay una unidad de control para registrar la temperatura con un data logger			
	Las unidades de control y las de test se almacenan juntas			
Almacenamiento de las unidades de test				
Condiciones de almacenamiento (estudios de potencial de crecimiento)	Se identifican las fases de la cadena de frío desde productor hasta consumidor			
Tiempos / Temperaturas de almacenamiento	Justificadas con información del operador económico			
	Justificadas con datos disponibles a nivel nacional			
	En su defecto, se usan las recomendadas en el DT			
Temperatura de almacenamiento para los ensayos de tasa máxima de crecimiento	Se hacen a temperatura constante			
Controles de la temperatura de las cámaras de almacenamiento de las muestras durante el test	Registros de temperatura			

Anexo 9

Número mínimo de unidades por lote	Especificaciones ISO 20976-1 y DT	Si	No	Comentarios
Para estudios de potencial de crecimiento	Número mínimo de puntos de muestreo: 5 (incluyendo T0 y Tfinal)			
	Número mínimo de unidades de test por cada punto de muestreo: 1, excepto para T0 que hacen falta 3			
	Si los tres lotes se analizan el mismo día, solo hace falta una unidad de test por cada lote en T0			
	Número mínimo de unidades de control para análisis microbiológico: 2 (una en T0 y otra en Tfinal)			
	Número mínimo de unidades de control para análisis físico-químicos: 2 (una en T0 y otra en Tfinal)			
	Número de unidades para control de temperatura: 1			
Para estudios de tasa máxima de crecimiento	Número mínimo de puntos de muestreo: 8 (al menos 5 han de estar en la fase exponencial de crecimiento)			
	Número mínimo de unidades de test por cada punto de muestreo: 1, excepto para T0 que hacen falta 3			
	Si los tres lotes se analizan el mismo día, solo hace falta una unidad de test por cada lote en T0			
	Número mínimo de unidades de control para análisis microbiológico: 2 (una en T0 y otra en Tfinal)			
	Número mínimo de unidades de control para análisis físico-químicos: 2 (una en T0 y otra en Tfinal)			
	Número de unidades para control de temperatura: 1			

Anexo 9

Análisis físico-químicos	Especificaciones ISO 20976-1 y DT	Si	No	Comentarios
Parámetros y número de muestras analizadas por lote	Medida del pH			
	<ul style="list-style-type: none"> Al menos una unidad de control en T0 y otra en Tfinal 			
	<ul style="list-style-type: none"> Una muestra de control alimentario en T0 			
	<ul style="list-style-type: none"> Se usa un método estandarizado o validado reconocido internacionalmente 			
	Medida de la aw			
	<ul style="list-style-type: none"> Al menos una unidad de control en T0 y otra en Tfinal 			
	<ul style="list-style-type: none"> Una muestra de control alimentario en T0 			
	<ul style="list-style-type: none"> Se usa un método estandarizado o validado reconocido internacionalmente 			
	Productos envasados			
	<ul style="list-style-type: none"> Medida de la composición gaseosa de la atmósfera de envasado 			
	<ul style="list-style-type: none"> Al menos una unidad de control en T0 y otra en Tfinal 			
	<ul style="list-style-type: none"> Dos muestras de control alimentario: una en T0 y otra en Tfinal 			
	Medidas de otros parámetros			

Anexo 9

Análisis microbiológicos	Especificaciones ISO 20976-1 y DT	Si	No	Comentarios
Detección de Lm	En una unidad de alimento control en T0, de acuerdo con:			
	El método de referencia: EN ISO 11290-1			
	Método alternativo validado según ISO 16140-2			
Enumeración de Lm	En 3 unidades de test en T0 y en 1 unidad de test en cada punto de muestreo, de acuerdo con:			
	El método de referencia: EN ISO 11290-2			
	Método alternativo validado según ISO 16140-2			
	El límite de enumeración es 10 ufc/g			
	Se verifica que se han contaminado todas las unidades de manera homogénea: la desviación estándar es $\leq 0.3 \log \text{ ufc/g}$			
Enumeración de la microflora total	En al menos una unidad de control en T0 y otra en Tfinal, con método estándar internacional o un método nacional			
	En una unidad de alimento control en T0, de acuerdo con un método estándar internacional o un método nacional			
Enumeración de la microflora específica (recomendado)	En al menos una unidad de control en T0 y otra en Tfinal, con método estándar internacional o un método nacional			
	En una unidad de alimento control en T0, de acuerdo con un método estándar internacional o un método nacional			

Anexo 9

	Especificaciones ISO 20976-1 y DT	Si	No	Comentarios
Determinación del potencial de crecimiento				
Método de cálculo	Se calcula la concentración de Lm en Log10 en T0 y en los 4 siguientes puntos de muestreo			
	Fórmula para calcular $\Delta = \log \text{max} - \log i$			
	Se calcula la desviación estándar en T0			
	Se determina Δ para cada lote			
	El mayor Δ calculado es el potencial de crecimiento			
	Si Δ es $>$ a $0.5 \log 10$, el alimento favorece el crecimiento de Lm			
Determinación de la tasa máxima de crecimiento				
Método de cálculo	Se determina la tasa para cada lote			
	Con las concentraciones de Lm expresadas el log10 ufc/g en cada punto de muestreo se dibuja la curva de crecimiento			
	Se calcula la tasa máxima, ajustando un modelo primario a la curva de crecimiento			
	Se usa un modelo de microbiología predictiva			
	Se determina el error estándar para cada μ_{max} calculada (1 por lote)			
	La tasa máxima es la media de las 3 μ_{max} calculadas con su desviación estándar			
Extrapolación de resultados	Se extrapola la curva de crecimiento obtenida a T del estudio a otras temperaturas			
	Se determina el crecimiento de Lm a un perfil realista de T/tiempo, hasta el final de la Vida útil del producto			

Anexo 9

INFORME DEL ENSAYO	Especificaciones ISO 20976-1 y DT	Si	No	Comentarios
Propósito del estudio y tipo de ensayo de desafío	Validación de la vida útil: sobre un único producto/ grupo de productos			
Identificación del alimento	Nombre			
	Descripción (composición, estructura, tipo envasado, fotografía)			
	Vida útil asignada a producto de nuevo desarrollo (PND)			
	Características del producto (físico-químicas y microbiológicas)			
	Identificación de los lotes estudiados			
Datos del ensayo de desafío	Nº de lotes analizados			
	Nº de unidades / lote			
	Cepas utilizadas			
	Preparación del inóculo			
	Concentración del inóculo			
	Preparación unidades de test: masa o volumen de las unidades de test, volumen de inóculo/unidad, tipo de envasado			
	Método de contaminación			
	Fechas de inoculación			
	Nivel de contaminación			
	Duración del ensayo, puntos de muestreo			
	T ^{as} / tiempos de almacenamiento y justificación			
	Método de detección y enumeración de Lm			
	Límite de enumeración Lm			
	Valores físico-químicos en T ₀ y T _{final}			
	Métodos utilizados			
	Composición atmósfera de envasado			
	Temperatura de la unidad de control			
	Concentración total y de microflora asociada en T ₀ y T _{fi}			
	Métodos de enumeración			
	Cálculo de Δ / lote			
Cálculo de μ_{max} /lote				
Conclusiones del estudio	Observaciones sobre validez de los datos y conclusiones			



Anexo 10. 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	0,96-0,99	6,3-6,5		Lenguado hervido		6,1-6,9
	Jamón serrano, cecina	0,85-0,93	5,9		Merluza asada		6,7-6,8
	Paté	0,97-0,98	6,2-6,4		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			Kéfir, kumis, 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 10

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	
	Limonos	≥ 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	

Anexo 11. 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	No detectado 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
			No detectado 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 1.1-1.2-1.3 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
- 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 $a_w \leq 0,92$, productos con $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$, 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.

Anexo 11

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.

Contenido de sal en la fase acuosa (WPS): porcentaje de sal en la fase acuosa de un producto.

Higrometría: medición de la humedad en aire y gas.

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.

Muestra de control alimentario: muestra de control que no se someta a preparación y que se utiliza para comprobar la representatividad de la producción.

Muestreo: procedimiento utilizado para seleccionar una o más unidades.

Percentil: el percentil x^o de un conjunto de valores que divide estos valores de manera que el x % de los valores se encuentra por debajo y el $(100-x)$ % de los valores se encuentra por encima. Ejemplos: El 90 % de los valores se sitúan en el percentil noventa o por debajo de él y el 10 %, por encima.

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.



Anexo 11

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 control: unidad alimenticia idéntica a las unidades de ensayo, pero que no esté contaminada de forma artificial, ya que solo se inocula con suero fisiológico (servirá de testigo).

Validar: obtener pruebas de que una medida de control o una combinación de medidas de control, si se aplican correctamente, es capaz de controlar el peligro hasta el nivel especificado.

Verificar: aplicar métodos, procedimientos, pruebas y otras evaluaciones, además del seguimiento, para determinar si una medida de control funciona o ha funcionado según lo previsto.

Vida útil: periodo de tiempo anterior a la fecha de la "fecha de duración mínima" o a la "fecha de caducidad", tal como se define en el artículo 24 del Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, que especifica las condiciones del marcado obligatorio de fechas de los productos alimenticios.



Anexo 11

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*)

EURL LM: Laboratorio Europeo de Referencia para *Listeria monocytogenes*

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





**Comunidad
de Madrid**

Dirección General de Salud Pública
CONSEJERÍA SANIDAD