



Estudios de vida útil específicos en laboratorio: estudios de durabilidad y ensayos de desafío.

Alfredo Palop

alfredo.palop@upct.es

CONTENIDOS:

- Introducción: Guía técnica sobre estudios de vida útil
- Estudios de durabilidad
- Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: estudio de durabilidad
- Ensayos de desafío
 - de crecimiento potencial
 - de velocidad máxima de crecimiento
- Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: ensayos de desafío

Introducción: guía técnica sobre estudios de vida útil

Estudios de vida útil específicos en laboratorio.

Estudios de durabilidad

Se realizan con el **alimento contaminado de forma natural** (sin inocular), simulando las condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles.

Se realiza en alimentos que tienen prevalencia elevada de *Listeria monocytogenes*.

Ensayos de desafío

Consisten en la **inoculación artificial** del alimento con una concentración definida de una mezcla de cepas de *Listeria monocytogenes* y en cuantificar su crecimiento en las condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles.

Se realiza en alimentos que tienen baja o nula contaminación de *Listeria monocytogenes*.

Introducción: guía técnica sobre estudios de vida útil



EURL Lm

European Union Reference Laboratory for

Listeria monocytogenes

EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT

for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods

Version 3 – 6 June 2014

Disponible en:

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_tech-guide-doc_listeria-in-rte-foods_en.pdf

La guía técnica

- El documento se ha preparado para laboratorios que realizan estudios de vida útil para empresas alimentarias.
- Los laboratorios deberían estar acreditados convenientemente para realizar estos estudios.

ANSES (2018). European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* EURL Lm Guidance Document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 2 – 7 May 2018. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance-comp-labs.pdf

- Esta pensada para productos envasados.

Consideraciones previas

- Los estudios de durabilidad son más realistas que los ensayos de desafío, ya que la contaminación es natural.
- Su utilidad es limitada en el caso de que la prevalencia y el nivel de contaminación sean bajos.

Hay que tener en cuenta:

- el método de muestreo.
- las condiciones de almacenamiento de las muestras.
- el método de enumeración de *L. monocytogenes*.

Método de muestreo

- Tiene que tener en cuenta la heterogeneidad de la producción
 - Se pueden utilizar como métodos de referencia las Normas ISO y el *Codex Alimentarius*
 - Directrices generales sobre muestreo **CAC/GL 50-2004**
 - Si no se dispone de información sobre la estructura del lote, se puede utilizar el **muestreo aleatorio simple**
 - Todas las unidades del lote tienen la misma probabilidad de ser seleccionadas
 - Por ejemplo con la fórmula “=RAND()” de Excel

Condiciones de almacenamiento

- Deberían ser similares a las habituales para el producto en su uso normal.
- Deberían incluir el rango de temperaturas típicas a lo largo de la cadena alimenticia, incluyendo la fabricación, distribución y almacenamiento por parte del consumidor.
- Tienen que considerar el almacenamiento a temperaturas de abuso
- Las temperaturas utilizadas en el ensayo tienen que estar adecuadamente justificadas y documentadas por la empresa.
 - Si la empresa dispone de datos de temperaturas de fabricación y distribución, es preferible utilizar estos datos:
 - Utilizar el **percentil 75** de los datos recogidos por la empresa
 - Si la empresa **no** dispone de datos de temperaturas, utilizar los datos de la tabla:

Condiciones de almacenamiento

- Condiciones habituales de incubación

Lugar cadena frío	Temperatura de almacenamiento	Duración almacenamiento	
		Vida útil <u>< 21 días</u>	Vida útil <u>> 21 días</u>
Producción	8 °C → 7 °C	1/3 de la vida útil	7 días
Venta por menor	12 °C → 7 °C	1/3 de la vida útil	½ vida útil – 7 días
Consumidor	12 °C	1/3 de la vida útil	½ vida útil – 7 días

Estas temperaturas han sido modificadas recientemente (feb 2019)

Análisis microbiológicos

- El método de referencia para la **enumeración** de *L. monocytogenes* es el **EN ISO 11290-2**, si bien se pueden emplear otros métodos alternativos debidamente validados.
 - **Dado que la concentración de referencia es 100 ufc/g, es conveniente bajar el límite de detección hasta 10 ufc/g**

Cálculos

- Se hace el recuento de ufc/g de *L. monocytogenes* en cada una de las unidades al final de su vida útil.
- Si se excede el criterio (100 ufc/g), el alimento no se considera seguro y no puede salir al mercado.

Interpretación de los resultados

- Se evalúa **la proporción** de unidades que excede 100 ufc/g.
- Hay que tener en cuenta los **intervalos de confianza** de esa proporción.
 - Existen distintas calculadoras disponibles para estos cálculos
 - http://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html
 - <https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>
- A más unidades analizadas, más estrecho es el intervalo.

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Planteamiento de la primera parte del ejemplo

La empresa X fabrica una ensalada tipo taboulé, lista para el consumo, con las siguientes características:

Ensalada taboulé

Vida útil declarada	12 días
Temperatura de conservación	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

El alimento presenta habitualmente recuentos de *Listeria monocytogenes* inferiores a 100 ufc/g en las muestras obtenidas al final de la vida útil.

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Aplicación del árbol de decisiones

1ª pregunta: ¿el alimento puede ser consumido directamente sin necesidad de cocinado o procesado de forma eficaz para eliminar o reducir *Listeria monocytogenes* a un nivel aceptable? **Si → ALC**

2ª pregunta: ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado? **No**

3ª pregunta: ¿El ALC está destinado a lactantes o a usos médicos especiales? **No**

4ª pregunta: ¿La empresa tiene evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en su ALC? (Cuando compara las características del ALC con la bibliografía científica).

No → *L. monocytogenes* puede crecer.

5ª pregunta: ¿Se han aplicado modelos adecuados de microbiología predictiva?

No, la empresa no presenta datos al respecto.

6ª pregunta: ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad?

¿?

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Resolución de la primera parte del ejemplo

Características del estudio de durabilidad realizado

- **Selección de las muestras:**
 - 200 muestras
 - Muestreo aleatorio simple de distintos lotes del mismo alimento
- **Almacenamiento de las muestras: 7°C durante 8 días + 12°C durante 4 días**
(el laboratorio no presenta registros de temperatura de la empresa ni datos del país, por lo que se utilizan las condiciones por defecto).
- **Análisis de las muestras** (laboratorio acreditado EN ISO 17025):
 - enumeración de *L. monocytogenes* al final de la vida útil.
 - método de enumeración EN ISO 11290-2
 - límite de detección: 10 ufc/g.

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	≤ 7°C
pH (valor medio)	5,7
a _w (valor medio)	0,99

Resolución de la primera parte del ejemplo

Cálculos:
Recuentos de *L. monocytogenes*
al final de su vida útil

Nº de muestra	Recuento (ufc/g)
1	34
2	11
3	19
4	30
5	11
6	21
7	25
8	<10
9	28
10	<10
11	35
12	29
13	<10
14	32
15	31
16	<10
17	26
18	<10
19	31
20	<10
21	27
22	35
23	12
24	33
25	13
26	12
27	30
28	26
29	<10
30	<10
31	11
32	12
33	<10
34	18
35	28
36	37
37	<10
38	<10
39	16
40	28
41	<10
42	31
43	12
44	10
45	33
46	<10
47	17
48	12
49	27
50	<10

Nº de muestra	Recuento (ufc/g)
51	<10
52	37
53	12
54	33
55	36
56	31
57	12
58	16
59	14
60	33
61	16
62	24
63	29
64	28
65	35
66	18
67	22
68	29
69	18
70	37
71	13
72	<10
73	28
74	10
75	11
76	38
77	<10
78	39
79	28
80	32
81	30
82	<10
83	35
84	19
85	10
86	25
87	13
88	<10
89	26
90	<10
91	29
92	19
93	39
94	37
95	28
96	<10
97	21
98	35
99	11
100	<10

Nº de muestra	Recuento (ufc/g)
101	10
102	37
103	<10
104	15
105	<10
106	<10
107	<10
108	<10
109	13
110	<10
111	<10
112	22
113	28
114	23
115	18
116	37
117	<10
118	18
119	<10
120	24
121	28
122	<10
123	31
124	31
125	26
126	<10
127	26
128	33
129	34
130	<10
131	31
132	28
133	21
134	23
135	<10
136	11
137	32
138	<10
139	<10
140	<10
141	34
142	<10
143	<10
144	24
145	28
146	37
147	22
148	17
149	16
150	38

Nº de muestra	Recuento (ufc/g)
151	24
152	38
153	34
154	<10
155	10
156	25
157	<10
158	<10
159	23
160	<10
161	34
162	33
163	10
164	15
165	18
166	14
167	11
168	39
169	36
170	13
171	25
172	11
173	20
174	18
175	35
176	<10
177	33
178	<10
179	35
180	40
181	10
182	39
183	37
184	10
185	31
186	<10
187	22
188	<10
189	<10
190	10
191	20
192	18
193	32
194	<10
195	<10
196	35
197	24
198	22
199	27
200	18

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Resolución de la primera parte del ejemplo

Interpretación de los resultados

- N° de muestras con > 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes*: 0
- Proporción de muestras con > 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes*: 0
- Intervalos de confianza al 95%

<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>

Intervalos de confianza al 95%: 0% - 2,3%

Teniendo en cuenta que el intervalo es inferior al 5%, el estudio de durabilidad se puede considerar **VÁLIDO**

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Respuesta al listado de verificación

B. ESTUDIOS DE DURABILIDAD	SÍ	NO
Se realiza un muestreo aleatorio simple	X	
El muestreo se repite para diferentes lotes a fin de tener en cuenta su variabilidad	X	
Se contemplan - condiciones de tiempo y temperatura “razonablemente previsibles” - transporte - distribución - consumo	X X X X	
El laboratorio que ha realizado los análisis cumple los requisitos mínimos exigibles a este tipo de laboratorios	X	
Se analizan usando los métodos de referencia o alternativos	X	

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Respuesta al listado de verificación

B. ESTUDIOS DE DURABILIDAD		SÍ	NO
Se calcula la proporción observada ($p=r/n$) de unidades que superan el límite de 100 ufc/g, donde “p” es la proporción, “r” las unidades que superan el límite y “n” las unidades analizadas		x	
Se calcula el intervalo de confianza asociado a esta proporción		x	
¿El estudio de durabilidad aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple con el criterio durante toda su vida útil?		x	
<i>Observaciones:</i>			

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Respuesta al árbol de decisiones

1ª pregunta: ¿el alimento puede ser consumido directamente sin necesidad de cocinado o procesado de forma eficaz para eliminar o reducir *Listeria monocytogenes* a un nivel aceptable? **Si → ALC**

2ª pregunta: ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado? **No**

3ª pregunta: ¿El ALC está destinado a lactantes o a usos médicos especiales? **No**

4ª pregunta: ¿La empresa tiene evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en su ALC? (Cuando compara las características del ALC con la bibliografía científica).

No → *L. monocytogenes* puede crecer.

5ª pregunta: ¿Se han aplicado modelos adecuados de microbiología predictiva?

No, la empresa no presenta datos al respecto.

6ª pregunta: ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad?

¿?

Si → Hay evidencias de que no se superarán las 100 ufc/g antes del fin de la vida útil si se presenta en el alimento

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Conclusión de la primera parte del ejemplo

La empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el alimento cumple el criterio de seguridad para *Listeria monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil.

El resultado de la verificación es **SUFICIENTE.**

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) 2073/2005

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	Categoría 1.2 Criterio: 100 ufc/g en el producto comercializado durante toda su vida útil (5)					
1.2 Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Ausencia en 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha

1.3 Alin
el consi
pueden
desarro
monoc
sean lo
lactante
médico
especia

(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.

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Planteamiento de la segunda parte del ejemplo

La empresa realiza otro estudio de durabilidad en otra ensalada taboulé.

Se han modificado los ingredientes, pero los valores de pH y a_w son similares.

Se ha establecido la misma temperatura de conservación y vida útil

Ensalada taboulé

Vida útil declarada	12 días
Temperatura de conservación	$\leq 7^\circ\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Resolución de la segunda parte del ejemplo

Características del estudio de durabilidad realizado

- **Selección de las muestras:**
 - 50 muestras
 - Muestreo aleatorio simple de distintos lotes del mismo alimento
- **Almacenamiento de las muestras: 7°C durante 8 días + 12°C durante 4 días**
(el laboratorio no presenta registros de temperatura de la empresa ni datos del país, por lo que se utilizan las condiciones por defecto).
- **Análisis de las muestras** (laboratorio acreditado EN ISO 17025):
 - enumeración de *L. monocytogenes* al final de la vida útil.
 - método de enumeración EN ISO 11290-2
 - límite de detección: 10 ufc/g.

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Resolución de la segunda parte del ejemplo

Cálculos:

Recuentos de *L. monocytogenes* al final de su vida útil.

Nº de muestra	Recuento (ufc/g)
1	22
2	19
3	21
4	35
5	11
6	29
7	18
8	22
9	19
10	39
11	22
12	34
13	< 10
14	19
15	< 10
16	< 10
17	< 10
18	31
19	22
20	35
21	12
22	32
23	38
24	25
25	21
26	< 10
27	12
28	11
29	< 10
30	< 10
31	< 10
32	37
33	18
34	< 10
35	< 10
36	11
37	< 10
38	19
39	15
40	18
41	< 10
42	< 10
43	13
44	11
45	25
46	19
47	14
48	< 10
49	30
50	< 10

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Resolución de la segunda parte del ejemplo

Interpretación de los resultados

- N° de muestras con > 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes*: 0
- Proporción de muestras con > 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes*: 0
- Intervalos de confianza al 95%

<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>

Intervalos de confianza al 95%: 0% - 8,6%

La empresa **NO demuestra** de manera satisfactoria que el alimento cumple el criterio de seguridad para *L. monocytogenes* durante toda su vida útil, ya que el intervalo llega al 8,6%, demasiado elevado.

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Respuesta al listado de verificación

B. ESTUDIOS DE DURABILIDAD	SÍ	NO
Se realiza un muestreo aleatorio simple	X	
El muestreo se repite para diferentes lotes a fin de tener en cuenta su variabilidad	X	
Se contemplan - condiciones de tiempo y temperatura “razonablemente previsibles” - transporte - distribución - consumo	X X X X	
El laboratorio que ha realizado los análisis cumple los requisitos mínimos exigibles a este tipo de laboratorios	X	
Se analizan usando los métodos de referencia o alternativos	X	

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Respuesta al listado de verificación

B. ESTUDIOS DE DURABILIDAD		SÍ	NO
Se calcula la proporción observada ($p=r/n$) de unidades que superan el límite de 100 ufc/g, donde “p” es la proporción, “r” las unidades que superan el límite y “n” las unidades analizadas		x	
Se calcula el intervalo de confianza asociado a esta proporción		x	
¿El estudio de durabilidad aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple con el criterio durante toda su vida útil?			x*
<i>Observaciones:</i>	* El intervalo de confianza es demasiado elevado		

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Respuesta al árbol de decisiones

1ª pregunta: ¿el alimento puede ser consumido directamente sin necesidad de cocinado o procesado de forma eficaz para eliminar o reducir *Listeria monocytogenes* a un nivel aceptable? **Si → ALC**

2ª pregunta: ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado? **No**

3ª pregunta: ¿El ALC está destinado a lactantes o a usos médicos especiales? **No**

4ª pregunta: ¿La empresa tiene evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en su ALC? (Cuando compara las características del ALC con la bibliografía científica).

No → *L. monocytogenes* puede crecer.

5ª pregunta: ¿Se han aplicado modelos adecuados de microbiología predictiva?

No, la empresa no presenta datos al respecto.

6ª pregunta: ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad?

¿?

Si → Hay evidencias de que podrían superarse las 100 ufc/g antes del fin de la vida útil si se presenta en el alimento

**Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil:
Estudio de durabilidad**

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Conclusión de la segunda parte del ejemplo

La valoración del estudio se considera **NO SUFICIENTE.**

Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil: Estudio de durabilidad

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) 2073/2005

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	Categoría 1.2					
		Criterio: 100 ufc/g en el producto comercializado durante toda su vida útil (7)					
1.2 Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
		5	0	Ausencia en 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha
1.3 Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4) (8)							

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

**Ejemplo de aplicación de estudios de vida útil:
Estudio de durabilidad**

Alternativas para conseguir una valoración suficiente en la segunda parte del ejemplo

Se sugiere a la empresa que amplíe el estudio de durabilidad con más muestras.

Vida útil declarada	12 días
Temperatura	$\leq 7^{\circ}\text{C}$
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Consideraciones previas

- Los ensayos de desafío deberían tener en cuenta la variabilidad entre lotes, muestras y cepas microbianas.
- La contaminación natural puede resultar difícil de imitar.
- Cuando el ensayo de desafío se refiere a un rango de productos, se debería realizar sobre el alimento que representa el *peor escenario* → condiciones más favorables para el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- La empresa es responsable de fijar la vida útil bajo condiciones razonablemente previsibles de fabricación, transporte, almacenamiento y utilización por parte de los consumidores.
- La empresa debería proporcionar toda la información relevante del producto al laboratorio, para que éste defina las condiciones experimentales.

Hay dos tipos de ensayos de desafío:

- **de crecimiento potencial:** se realiza el recuento al principio y al final del almacenamiento y se estima el crecimiento a partir de estos resultados.
- **de velocidad máxima de crecimiento:** se realizan recuentos a distintos tiempos de almacenamiento, trazándose la correspondiente curva de crecimiento y se estima la velocidad a partir de su pendiente.

Lotes a analizar

Su número depende de:

- Probabilidad de crecimiento
 - Se puede determinar mediante un modelo predictivo de crecimiento / no crecimiento:
 - Si probabilidad de crecimiento $> 10\%$ → al menos **3 lotes**
 - Si no hay probabilidad de crecimiento o es $\leq 10\%$ → **1 lote**
- Variabilidad entre lotes
 - Se puede determinar mediante una calculadora, por ejemplo la desarrollada por ANSES (<http://www.ansespro.fr/eurl-listeria/index.htm>)
 - Se refiere al efecto que tiene la variabilidad entre lotes en los parámetros que pueden afectar al crecimiento de *Listeria monocytogenes* (pH, a_w , etc.):
 - Si este efecto es despreciable → **1 lote**
 - Si este efecto es significativo → al menos **3 lotes**

Cuando se analizan al menos 3 lotes, se eligen:

- Los lotes con las características físico-químicas más favorables al crecimiento.
- Que no hayan sido producidos al mismo tiempo.

Elección de las cepas

Se debería utilizar un inóculo de distintas cepas, al menos dos:

- Una de las cepas del laboratorio de referencia (ANSES)
 - ANSES tiene una colección de cepas disponible para laboratorios
 - Estas cepas tienen unas características de crecimiento conocidas
- La(s) otra(s) cepa(s) puede(n) ser elegida(s) libremente
 - alimentos, ambiente, brotes, otras colecciones...

Si el ensayo se tiene que realizar en planta piloto, debe utilizarse un microorganismo sustituto no patógeno, como *Listeria innocua*

Conservación de las cepas

El método de conservación de las cepas debería evitar las mutaciones que puedan afectar a sus características de crecimiento o supervivencia.

Las características de crecimiento, bioquímicas y serogenotípicas deberían ser comprobadas de manera ocasional.

Preparación del inóculo

Cada cepa se subcultiva dos veces:

- Inicialmente:
 - en un medio favorable (BHI, TSB...)
 - a temperatura óptima (30 – 37°C)
 - durante el tiempo necesario para alcanzar fase estacionaria temprana (15 – 18 h para las cepas del laboratorio de referencia)

→ se pretende que todas las cepas se encuentren en el mismo estado fisiológico
- A continuación:
 - A temperatura próxima a la de conservación del alimento (7-10°C)
 - durante el tiempo necesario para alcanzar fase estacionaria temprana (7 días a 7°C o 3 días a 10°C para las cepas del laboratorio de referencia)

→ se pretende que las cepas se adapten a la temperatura de conservación del alimento

Preparación del inóculo

Cada cepa se subcultiva dos veces.

(estreses adicionales pueden ser incluidos si se considera conveniente)

A continuación:

- se mezclan los segundos subcultivos en cantidades iguales.
- se preparan diluciones sucesivas del cultivo mixto
 - en agua fisiológica
 - a la temperatura del segundo subcultivo (7 – 10°C)
 - hasta obtener un inóculo de la concentración deseada
 - (la concentración del inóculo se comprueba por recuento en medio selectivo)
- este cultivo debe ser utilizado inmediatamente

Ensayos de desafío de crecimiento potencial

Inoculación de las muestras

Número mínimo de unidades a preparar por lote:

	día inicial	día final
Enumeración de <i>L. monocytogenes</i> en las unidades inoculadas	3	3
Detección de <i>L. monocytogenes</i> en las unidades no inoculadas	3	3
Determinación de las características fisico-químicas en unidades no inoculadas		
Determinación de la composición de la atmósfera en unidades no inoculadas (en productos envasados en atmósferas protectoras)	1	1
Enumeración de la microbiota asociada en unidades no inoculadas		

Total: 8 unidades

Pero es muy recomendable incluir puntos de muestreo intermedios

Inoculación de las muestras

Procedimiento de inoculación:

(se trata de un paso crítico en el desarrollo del ensayo de desafío)

- Debería mantener las propiedades intrínsecas del alimento
 - volumen del inóculo <1% volumen (masa) de la muestra
- Se recomienda inocular:
 - extrayendo el alimento del envase, inoculándolo y volviéndolo a envasar en una atmósfera similar
 - **En profundidad:** en alimentos homogéneos o con mezcla de distintos ingredientes (como en una ensalada)
 - **En superficie:** para simular la contaminación de ciertas partes durante el procesado (como en productos loncheados)
 - En alimentos con capas (como un sándwich) se debería inocular uno o pocos componentes o capas
 - manteniendo el alimento en su envase e inoculándolo **en superficie** a través de un septum que luego se cerrara

El nivel de contaminación inicial debería ser en torno a 100 ufc/g

Preparación de las muestras no inoculadas

Detección de *L. monocytogenes* el día inicial

(No debe añadirse agua fisiológica a las muestras empleadas para detectar *L. monocytogenes*)

Si se detecta presencia de *L. monocytogenes* en estas muestras no inoculadas, el resultado del ensayo de desafío no es válido

Preparación de las muestras no inoculadas

Características físico-químicas y microbiota asociada

(Hay que añadir un volumen de agua fisiológica estéril idéntico al volumen del inóculo de *L. monocytogenes*)

- Este análisis es necesario para poder comparar las muestras sometidas a ensayos de desafío con las muestras producidas habitualmente por la empresa.
- Las características físico-químicas deben determinarse de acuerdo a métodos estandarizados
- La microbiota asociada puede proporcionar información adicional sobre interacciones entre ésta y *L. monocytogenes* que afecten a su crecimiento.
- En función de la microbiota habitual del alimento, se puede analizar (mediante métodos ISO):
 - microorganismos aerobios mesófilos
 - bacterias ácido-lácticas
 - hongos y levaduras
 - *Pseudomonas*, etc.

Control de las cepas

(Se realiza para determinar si el crecimiento de *L. monocytogenes* está limitado por las condiciones de almacenamiento o por el mismo alimento)

- Se inocula individualmente cada cepa en un caldo de cultivo no selectivo y se incuba bajo las mismas condiciones que las muestras del ensayo de desafío.
- El crecimiento se determina por turbidimetría o por recuento.

Condiciones de almacenamiento

(Como en los estudios de durabilidad)

- Deberían ser similares a las habituales para el producto en su uso normal.
- Deberían incluir el rango de temperaturas típicas a lo largo de la cadena alimenticia, incluyendo la fabricación, distribución y almacenamiento por parte del consumidor.
- Tienen que considerar el almacenamiento a temperaturas de abuso
- Las temperaturas utilizadas en el ensayo tienen que estar adecuadamente justificadas y documentadas por la empresa.
 - Si la empresa dispone de datos de temperaturas de fabricación y distribución, es preferible utilizar estos datos:
 - Utilizar el **percentil 75** de los datos recogidos por la empresa
 - Si la empresa **no** dispone de datos de temperaturas, utilizar los datos de la tabla:

Ensayos de desafío de crecimiento potencial

Condiciones de almacenamiento

- Condiciones habituales de incubación

Lugar cadena frío	Temperatura de almacenamiento	Duración almacenamiento	
		Vida útil <u>< 21 días</u>	Vida útil <u>> 21 días</u>
Producción	8 °C → 7 °C	1/3 de la vida útil	7 días
Venta por menor	12 °C → 7 °C	1/3 de la vida útil	½ vida útil – 7 días
Consumidor	12 °C	1/3 de la vida útil	½ vida útil – 7 días

Temperaturas han sido modificadas recientemente (feb 2019)

Análisis microbiológicos

(Como en los estudios de durabilidad)

- El laboratorio debería estar acreditado (EN ISO 17025) para la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos.

ANSES (2018). European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* EURL Lm Guidance Document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 2 – 7 May 2018. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance-comp-labs.pdf

- El método de referencia para la **detección** de *L. monocytogenes* es el **EN ISO 11290-1**, si bien se pueden emplear otros métodos alternativos debidamente validados.
- El método de referencia para la **enumeración** de *L. monocytogenes* es el **EN ISO 11290-2**, si bien se pueden emplear otros métodos alternativos debidamente validados.
 - **Dado que la concentración de referencia es 100 ufc/g, es conveniente bajar el límite de detección hasta 10 ufc/g**

Cálculo del potencial de crecimiento (δ)

- Es la diferencia entre la mediana de los recuentos de *L. monocytogenes* al final y al principio del ensayo de desafío.
 - Tras inocular cada unidad y realizar el recuento del día inicial, es recomendable calcular la desviación estándar de los logaritmos de los recuentos del día inicial
 - Si **desviación estándar > 0,5 log ufc/g** → **ensayo no aceptable**
- Se calcula el potencial de crecimiento (δ) para cada lote.
- El potencial de crecimiento es el mayor valor de todos los obtenidos entre los distintos lotes.

Interpretación de los resultados

- Si el potencial de crecimiento (δ) $> 0,5$ log ufc/g, ***L. monocytogenes* es capaz de crecer en el alimento.**
- Si el potencial de crecimiento (δ) $\leq 0,5$ log ufc/g, ***L. monocytogenes* NO es capaz de crecer en el alimento.**
- Los resultados del ensayo de desafío aplican únicamente al producto analizado.
- Cualquier cambio en la receta del producto, su procesado, etc., invalidan los resultados y precisarían realizarlo de nuevo.

Informe de resultados

Debería incluir, al menos, la siguiente información:

- Número del informe.
- Objeto del estudio.
- Tipo de ensayo de desafío
- Identificación del alimento (nombre, características, vida útil prevista, identificación de lotes y fechas del estudio)
- Datos del ensayo de desafío:

Informe de resultados

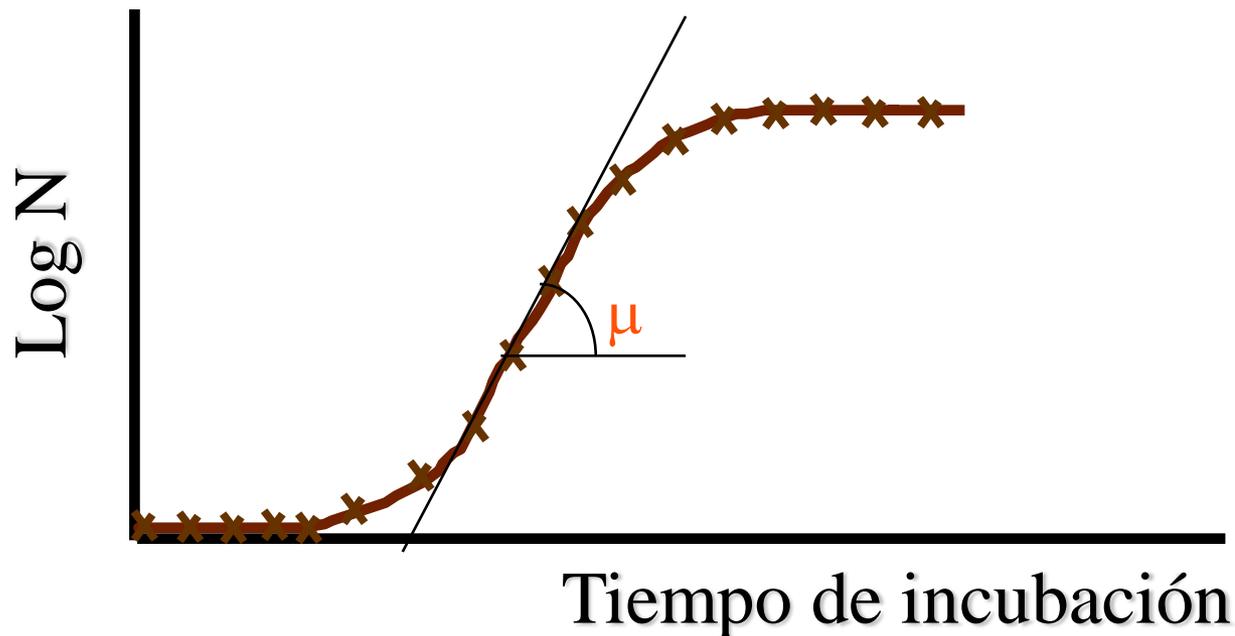
Debería incluir, al menos, la siguiente información:

- Datos del ensayo de desafío:
 - Número de lotes ensayados y justificación
 - Número de unidades por lote y por día de análisis
 - Masa o volumen de las unidades inoculadas
 - Cepas usadas, características y justificación de su uso
 - Preparación del inóculo
 - Concentración del inóculo
 - Volumen de inóculo introducido por unidad de muestra
 - Método de contaminación
 - Fecha de inoculación
 - Duración del ensayo e intervalos de muestreo
 - Temperatura(s) de almacenamiento y justificación
 - Duración del almacenamiento y justificación
 - Métodos de detección y enumeración utilizados
 - Límite de enumeración
 - Valores de las características físico-químicas al principio y al final del ensayo
 - Atmósfera gaseosa
 - Concentración de microbiota asociada al principio y al final del ensayo
 - Concentración de *Listeria monocytogenes* al principio y al final del ensayo
 - Potencial de crecimiento por lote
 - Conclusión

Ensayos de desafío

Hay dos tipos de ensayos de desafío:

- **de crecimiento potencial:** se realiza el recuento al principio y al final del almacenamiento y se estima el crecimiento a partir de estos resultados.
- **de velocidad máxima de crecimiento:** se realizan recuentos a distintos tiempos de almacenamiento, trazándose la correspondiente curva de crecimiento y se estima la velocidad a partir de su pendiente.



Consideraciones generales

- Consisten en medir la velocidad de crecimiento *Listeria monocytogenes* en un alimento contaminado de forma artificial y almacenado a una temperatura fija.
- Son más flexibles:
 - Permiten conocer la concentración del microorganismo en cualquier día de la vida útil del alimento.
 - Permiten extrapolar el comportamiento a otras temperaturas, en el mismo alimento
- Son pruebas más caras y requieren más tiempo.

Ensayos de desafío de velocidad máxima de crecimiento

Se realiza como los ensayos de crecimiento potencial:

- **Lotes a analizar**
- **Medida de las características físico-químicas de la muestra**
- **Análisis microbiológicos**

Elección de las cepas

Se deberían utilizar al menos dos cepas para cada lote, **pero separadas:**

- Una cepa de características de crecimiento conocidas
 - por ejemplo, de las cepas del laboratorio de referencia (ANSES)
- La(s) otra(s) cepa(s) puede(n) ser elegida(s) libremente
 - alimentos, ambiente, brotes, otras colecciones...
 - no es necesario conocer las características de esta(s) cepa(s)

Preparación del inóculo

Las condiciones son las mismas que en los ensayos de desafío de crecimiento potencial, excepto que no se mezclan.

Se usan individualmente.

Ensayos de desafío de velocidad máxima de crecimiento

Inoculación de las muestras

Número mínimo de unidades a preparar por lote:

Enumeración de <i>L. monocytogenes</i> en las unidades inoculadas	10 a 15 (5 a 7 en fase exponencial)		
	día inicial	día final	
Detección de <i>L. monocytogenes</i> en las unidades no inoculadas	3	3	
Determinación de las características fisico-químicas en unidades no inoculadas			
Determinación de la composición de la atmósfera en unidades no inoculadas (en productos envasados en atmósferas protectoras)	1	1	
Enumeración de la microbiota asociada en unidades no inoculadas			

El procedimiento de inoculación es similar al de los ensayos de crecimiento potencial, pero con **una sola cepa por curva de crecimiento**.

Condiciones de almacenamiento a una temperatura fija

Cálculo de la velocidad máxima de crecimiento

- Mediante herramientas de microbiología predictiva
- Se tiene en cuenta la velocidad más alta de las calculadas para los distintos lotes y cepas
- A partir del cálculo de la velocidad de crecimiento a una temperatura se puede calcular la correspondiente a cualquier otra temperatura (inferior a 25°C):

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

siendo:

- **T**: temperatura para la que se quiere calcular la vel. de crecimiento
- **rate**: velocidad máxima de crecimiento a la temperatura T
- **T_{ref}**: temperatura a la que se ha estimado la velocidad máxima de crecimiento en el laboratorio
- **T_{min}**: temperatura mínima de crecimiento de *L. monocytogenes* (≈ -1,5°C)

Informe de resultados

Debería incluir, al menos, la siguiente información:

- Como para los ensayos de potencial de crecimiento
- Número del informe.
- Objeto del estudio.
- Tipo de ensayo de desafío
- Identificación del alimento (nombre, características, vida útil prevista, identificación de lotes y fechas del estudio)
- Datos del ensayo de desafío:

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Planteamiento del ejemplo

La empresa X fabrica ensalada de col lista para el consumo con las siguientes características:

Ensalada de col

Vida útil declarada	21 días
pH (valor medio)	5,49
a_w (valor medio)	0,99

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	21 días
pH (valor medio)	5,49
a _w (valor medio)	0,99

Aplicación del árbol de decisiones

1ª pregunta: ¿el alimento puede ser consumido directamente sin necesidad de cocinado o procesado de forma eficaz para eliminar o reducir *Listeria monocytogenes* a un nivel aceptable? **Si → ALC**

2ª pregunta: ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado? **No**

3ª pregunta: ¿El ALC está destinado a lactantes o a usos médicos especiales? **No**

4ª pregunta: ¿La empresa tiene evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en su ALC? (Cuando compara las características del ALC con la bibliografía científica).

No → *L. monocytogenes* puede crecer.

5ª pregunta: ¿Se han aplicado modelos adecuados de microbiología predictiva?

No, la empresa no presenta datos al respecto.

6ª pregunta: ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad?

No, la empresa no presenta datos al respecto

7ª pregunta: ¿Se ha realizado un ensayo de desafío según se describe en la guía?

¿?

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	21 días
pH (valor medio)	5,49
a _w (valor medio)	0,99

Resolución del ejemplo

Características del ensayo de desafío realizado

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de ensalada de col.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** tres cepas distintas
 - 1 cepa del laboratorio europeo de referencia
 - 2 cepas del laboratorio que realizó el ensayo de desafío
- **Preparación del inóculo:**
 - cada cepa crece en BHI a 37°C durante 24 h.
 - segundo cultivo de cada cepa en BHI a 10°C durante 5 días.
 - cóctel: mezcla de las tres cepas en cantidades iguales.
- **Inoculación de las muestras:**
 - se realizaron varias diluciones del coctel de cepas.
 - se inocula en profundidad, con 1% (p/v) de la masa de las muestras de ensalada de col y se mezclan intensamente.
 - las muestras se envasan a vacío.
 - Nivel de inoculación: **2,49 ± 0,11 log ufc/g**

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	21 días
pH (valor medio)	5,49
a _w (valor medio)	0,99

Resolución del ejemplo

Características del ensayo de desafío realizado

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de ensalada de col.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** tres cepas distintas
- **Preparación del inóculo.**
- **Inoculación de las muestras.**
- **Almacenamiento de las muestras: 7°C durante 14 días + 12°C durante 7 días**
(el laboratorio no presenta registros de temperatura de la empresa ni datos del país, por lo que se utilizan las condiciones por defecto).
- **Análisis de las muestras** (laboratorio acreditado EN ISO 17025):
 - enumeración de *L. monocytogenes* al principio, punto intermedio y final del ensayo de desafío.
 - determinación de pH, a_w y flora aerobia mesófila en esos tres puntos.

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	21 días
pH (valor medio)	5,49
a _w (valor medio)	0,99

Resolución del ejemplo

Características del ensayo de desafío realizado

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de ensalada de col.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** tres cepas distintas
- **Preparación del inóculo.**
- **Inoculación de las muestras.**
- **Almacenamiento de las muestras:** 7°C durante 14 días + 12°C durante 7 días
- **Análisis de las muestras.**
- **Cálculo del potencial de crecimiento:**

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	21 días
pH (valor medio)	5,49
a _w (valor medio)	0,99

Resolución del ejemplo

Características del ensayo de desafío realizado

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de ensalada de col.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** tres cepas distintas
- **Preparación del inóculo.**
- **Inoculación de las muestras.**
- **Almacenamiento de las muestras:** 7°C durante 14 días + 12°C durante 7 días
- **Análisis de las muestras.**
- **Cálculo del potencial de crecimiento:**
 - **Potencial de crecimiento (δ): no se puede determinar:**
 - Recuentos por debajo del límite de detección al final de la vida útil.
 - En un punto intermedio (7 días): -1,20 log ufc/g (peor escenario posible)
 - **Potencial de crecimiento negativo**
 - Si $\delta \leq 0,5$ log ufc/g, *L. monocytogenes* **NO** es capaz de crecer en el alimento.

**Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil:
Ensayo de desafío**

Respuesta al listado de verificación

C. ENSAYOS DE DESAFÍO	SÍ	NO
Se han realizado ensayos de desafío para valorar la capacidad de un microorganismo para crecer en el alimento (potencial de crecimiento)	X	
En los ensayos de desafío para valorar el potencial de crecimiento, se han contemplado las condiciones razonablemente previsibles de: <ul style="list-style-type: none"> - transporte - distribución - almacenamiento - consumo 	X X X X	
Se han realizado ensayos de desafío para estimar los parámetros de crecimiento de un microorganismo (velocidad máxima de crecimiento)		X
Se ha contemplado la heterogeneidad del producto y se ha elegido el número de lotes en función de esa heterogeneidad; las pruebas se realizan sobre varias unidades por cada lote.	X	

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Respuesta al listado de verificación

C. ENSAYOS DE DESAFÍO		SÍ	NO
Se describe: - la elección de la/s cepa/s inoculada/s - el precultivo - la concentración inicial - la distribución del inóculo		X X X X	
El laboratorio que ha realizado los análisis cumple los requisitos mínimos exigibles a este tipo de laboratorios		X	
Se analizan usando los métodos de referencia o alternativos		X	
Se incluyen los cálculos realizados para valorar el potencial de crecimiento o la velocidad máxima de crecimiento en los escenarios contemplados (*)			X*
¿El Ensayo de desafío aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple con el criterio durante toda su vida útil?		X	
<i>Observaciones:</i>	*No se han podido realizar los cálculos ya que al final de la vida útil los recuentos se encontraban por debajo del límite de detección.		

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Respuesta al árbol de decisiones

1ª pregunta: ¿el alimento puede ser consumido directamente sin necesidad de cocinado o procesado de forma eficaz para eliminar o reducir *Listeria monocytogenes* a un nivel aceptable? **Si → ALC**

2ª pregunta: ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado? **No**

3ª pregunta: ¿El ALC está destinado a lactantes o a usos médicos especiales? **No**

4ª pregunta: ¿La empresa tiene evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en su ALC? (Cuando compara las características del ALC con la bibliografía científica).

No → *L. monocytogenes* puede crecer.

5ª pregunta: ¿Se han aplicado modelos adecuados de microbiología predictiva?

No, la empresa no presenta datos al respecto.

6ª pregunta: ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad?

No, la empresa no presenta datos al respecto

7ª pregunta: ¿Se ha realizado un ensayo de desafío según se describe en la guía?

¿?

Si → No hay potencial de crecimiento o es limitado

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	21 días
pH (valor medio)	5,49
a _w (valor medio)	0,99

Conclusión

La empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el alimento cumple el criterio de seguridad para *Listeria monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil.

El resultado de la verificación es SUFICIENTE.

El alimento pasa a clasificarse dentro de la categoría 1.3.

No obstante, cualquier cambio en la receta del producto, su procesado, etc., invalidaría los resultados del estudio de vida útil y precisaría realizarlo de nuevo.

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) 2073/2005

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c			
1.1 Alimento para el consumo de los lactantes listos para el consumo destinados a médicos especiales	<p>Categoría 1.3 Criterio: 100 ufc/g en el producto comercializado durante toda su vida útil</p> <p>Productos comercializados durante su vida útil</p>					
1.2 Alimentos para el consumo que favorecen el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> no sean los destinados a médicos especiales	<p>(8) Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con $pH \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5,0$ 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.</p>					
1.3 Alimentos listos para el consumo 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)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Planteamiento del ejemplo

La empresa X fabrica paté con las siguientes características:

Paté

Vida útil declarada	14 días
pH (valor medio)	6,20
a_w (valor medio)	0,97

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	14 días
pH (valor medio)	6,20
a _w (valor medio)	0,97

Aplicación del árbol de decisiones

1ª pregunta: ¿el alimento puede ser consumido directamente sin necesidad de cocinado o procesado de forma eficaz para eliminar o reducir *Listeria monocytogenes* a un nivel aceptable? **Si → ALC**

2ª pregunta: ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado? **No**

3ª pregunta: ¿El ALC está destinado a lactantes o a usos médicos especiales? **No**

4ª pregunta: ¿La empresa tiene evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en su ALC? (Cuando compara las características del ALC con la bibliografía científica).

No → *L. monocytogenes* puede crecer.

5ª pregunta: ¿Se han aplicado modelos adecuados de microbiología predictiva?

No, la empresa no presenta datos al respecto.

6ª pregunta: ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad?

No, la empresa no presenta datos al respecto

7ª pregunta: ¿Se ha realizado un ensayo de desafío según se describe en la guía?

¿?

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	14 días
pH (valor medio)	6,20
a _w (valor medio)	0,97

Resolución del ejemplo

Características del ensayo de desafío realizado

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de paté.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** tres cepas distintas
 - 1 cepa del laboratorio europeo de referencia
 - 2 cepas del laboratorio que realizó el ensayo de desafío
- **Preparación del inóculo:**
 - cada cepa crece en BHI a 37°C durante 24 h.
 - segundo cultivo de cada cepa en BHI a 10°C durante 5 días.
 - cóctel: mezcla de las tres cepas en cantidades iguales.
- **Inoculación de las muestras:**
 - se realizaron varias diluciones del coctel de cepas.
 - se inocula en superficie, con 1% (p/v) de la masa de las muestras de paté.
 - el inóculo se extiende en la superficie del paté con asa de siembra estéril.
 - las muestras se mantienen en cabina de flujo laminar 15 min hasta su completo secado superficial.
 - las muestras se envasan a vacío.
 - Nivel de inoculación: **1,84 ± 0,07 log ufc/g**

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	14 días
pH (valor medio)	6,20
a_w (valor medio)	0,97

Resolución del ejemplo

Características del ensayo de desafío realizado

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de paté.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** tres cepas distintas
- **Preparación del inóculo.**
- **Inoculación de las muestras.**
- **Almacenamiento de las muestras: 8°C durante 14 días**
(el laboratorio presenta registros de temperatura de la empresa y datos del país, tanto a nivel de venta, como a nivel doméstico, que apoyan la utilización de esas temperaturas de almacenamiento).
- **Análisis de las muestras** (laboratorio acreditado EN ISO 17025):
 - enumeración de *L. monocytogenes* al principio, punto intermedio y final del ensayo de desafío.
 - determinación de pH, a_w y flora aerobia mesófila en esos tres puntos.

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	14 días
pH (valor medio)	6,20
a _w (valor medio)	0,97

Resolución del ejemplo

Características del ensayo de desafío realizado

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de paté.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** tres cepas distintas
- **Preparación del inóculo.**
- **Inoculación de las muestras.**
- **Almacenamiento de las muestras:** 8°C durante 14 días
- **Análisis de las muestras.**
- **Cálculo del potencial de crecimiento:**

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	14 días
pH (valor medio)	6,20
a _w (valor medio)	0,97

Resolución del ejemplo

Características del ensayo de desafío realizado

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de paté.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** tres cepas distintas
- **Preparación del inóculo.**
- **Inoculación de las muestras.**
- **Almacenamiento de las muestras:** 8°C durante 14 días
- **Análisis de las muestras.**
- **Cálculo del potencial de crecimiento:**
 - diferencia entre la mediana de los recuentos de *L. monocytogenes* al final y al principio del ensayo de desafío.
 - se calcula para cada lote y se toma el valor mayor.
 - **Potencial de crecimiento (δ): 4,87 log ufc/g.**
 - Si $\delta > 0,5$ log ufc/g, *L. monocytogenes* es capaz de crecer en el alimento.

**Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil:
Ensayo de desafío**

Respuesta al listado de verificación

C. ENSAYOS DE DESAFÍO	SÍ	NO
Se han realizado ensayos de desafío para valorar la capacidad de un microorganismo para crecer en el alimento (potencial de crecimiento)	X	
En los ensayos de desafío para valorar el potencial de crecimiento, se han contemplado las condiciones razonablemente previsibles de: <ul style="list-style-type: none"> - transporte - distribución - almacenamiento - consumo 	X X X X	
Se han realizado ensayos de desafío para estimar los parámetros de crecimiento de un microorganismo (velocidad máxima de crecimiento)		X
Se ha contemplado la heterogeneidad del producto y se ha elegido el número de lotes en función de esa heterogeneidad; las pruebas se realizan sobre varias unidades por cada lote.	X	

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Respuesta al listado de verificación

C. ENSAYOS DE DESAFÍO		SÍ	NO
Se describe: - la elección de la/s cepa/s inoculada/s - el precultivo - la concentración inicial - la distribución del inóculo		X X X X	
El laboratorio que ha realizado los análisis cumple los requisitos mínimos exigibles a este tipo de laboratorios		X	
Se analizan usando los métodos de referencia o alternativos		X	
Se incluyen los cálculos realizados para valorar el potencial de crecimiento o la velocidad máxima de crecimiento en los escenarios contemplados (*)			X*
¿El Ensayo de desafío aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple con el criterio durante toda su vida útil?			X
<i>Observaciones:</i>	*No se han incluyen los datos concretos de los cálculos realizados, pero si se describe la manera en que se han llevado a cabo, que es acorde con lo descrito en la guía técnica.		

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Respuesta al árbol de decisiones

1ª pregunta: ¿el alimento puede ser consumido directamente sin necesidad de cocinado o procesado de forma eficaz para eliminar o reducir *Listeria monocytogenes* a un nivel aceptable? **Si → ALC**

2ª pregunta: ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado? **No**

3ª pregunta: ¿El ALC está destinado a lactantes o a usos médicos especiales? **No**

4ª pregunta: ¿La empresa tiene evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en su ALC? (Cuando compara las características del ALC con la bibliografía científica).

No → *L. monocytogenes* puede crecer.

5ª pregunta: ¿Se han aplicado modelos adecuados de microbiología predictiva?

No, la empresa no presenta datos al respecto.

6ª pregunta: ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad?

No, la empresa no presenta datos al respecto

7ª pregunta: ¿Se ha realizado un ensayo de desafío según se describe en la guía?

¿?

Si → Hay potencial de crecimiento

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Vida útil declarada	14 días
pH (valor medio)	6,20
a _w (valor medio)	0,97

Conclusión

La empresa **no** ha mostrado evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil.

El resultado de la verificación es **NO SUFICIENTE.**

Ejemplos de aplicación de estudios de vida útil: Ensayo de desafío

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) 2073/2005

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	Categoría 1.2					
Criterio: ausencia en 25 g antes de que abandone el control inmediato del explotador (7)							
1.2 Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
		5	0	Ausencia en 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha
1.3 Alin el consi pueden desarro <i>monoc</i> sean lo: lactante médicos especiales (4) (8)							

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



Estudios de vida útil específicos en laboratorio: estudios de durabilidad y ensayos de desafío.

Alfredo Palop

alfredo.palop@upct.es



Universidad
Politécnica
de Cartagena

¡Muchas gracias por su atención!