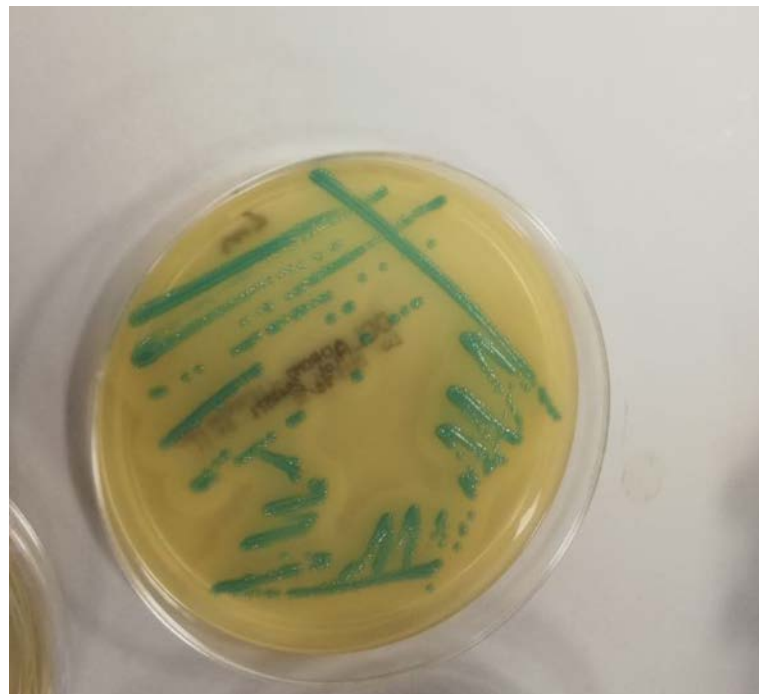




DOCUMENTO DE ORIENTACIÓN PARA LA VERIFICACIÓN DE ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL EN RELACIÓN CON *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO

Aprobado en la Comisión Institucional del 16/10/2019



NOTA IMPORTANTE: Esta nota, que debe ser entendida en su integridad y nunca de modo parcial, cumple una función meramente informativa, careciendo, por tanto, en el plano jurídico, de valor vinculante alguno

La Comisión Institucional es el órgano colegiado de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición encargado de establecer mecanismos eficaces de coordinación y cooperación entre las Administraciones Públicas con competencias en materia de seguridad alimentaria. Está integrada por representantes de los Ministerios de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente y de Economía, Industria y Competitividad, las Comunidades Autónomas, las ciudades de Ceuta y de Melilla y las entidades locales.



Grupo Redactor:

Coordinadora: Alicia Rubio González (Servicio de Gestión del Riesgo. Consejería de Sanidad Universal y Salud Pública. Valencia)

Antonio Español Pueyo (Subdirector Provincial de Salud Pública de Huesca. Aragón)

Jose Ignacio Altolaguirre Bernacer (Jefe del Servicio de Riesgos Ambientales y Alimentarios. Asturias).

Laura Cabedo Botella (Responsable de Programas de Vigilancia de la Inocuidad de los Alimentos. Cataluña).

Amadeo Vázquez Vassot (Jefe de la Sección del Servicio de Ganadería. Islas Baleares)

Silvia Iñigo Núñez (Jefa de Área de Higiene Alimentaria, Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria. Madrid)

Encarnación Madrid Verdugo (Servicio de Seguridad Alimentaria y Laboratorios. Consejería de Salud. Andalucía)

Pablo Fernandez Escámez. BIOQURA.

Alfredo Palop Gómez. BIOQURA.

Coordinación Técnica

Inés Blanco Pérez. AESAN.

Beatriz Martínez Zamorano. AESAN.

Cristina Ocerín Cañón. AESAN.

María Jesús Zamora Escribano. CNA.



TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETO	5
3. BASE LEGAL Y DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA	5
4. CATEGORIAS DE ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO	6
5. VERIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL.	10
5. A-VERIFICACIÓN DE ESTUDIOS DESARROLLADOS POR LAS PROPIAS EMPRESAS	10
5.B-VERIFICACIÓN DE ESTUDIOS DESARROLLADOS POR COLABORACION ENTRE EMPRESAS	12
6. REVISIÓN DE LOS ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL.....	14
ANEXO I: <i>Especificaciones de los diferentes tipos de estudios de vida útil</i>	15
I.1. Características físico-químicas	15
I.2. Bibliografía científica.....	16
I.3. Histórico de datos.	17
I.4 Estudios complementarios	18
I.4.a-Microbiología Predictiva (modelos matemáticos).....	18
I.4.b-Pruebas de laboratorio específicas	20
ANEXO II: <i>Tecnología de los obstáculos o de barreras</i>	27
ANEXO III: <i>Árbol de decisiones</i>	29
ANEXO IV: <i>Listados de verificación</i>	33
ANEXO V: Ejemplos de aplicación	37



1. INTRODUCCIÓN

La listeriosis es una zoonosis de transmisión alimentaria que afecta principalmente a poblaciones de riesgo (mayores de 65 años, inmunodeprimidos, mujeres embarazadas y neonatos), que se presenta con baja prevalencia y una elevada tasa de letalidad.

Esta enfermedad puede ser potencialmente producida por alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes*, siendo los alimentos listos para el consumo (ALC) los identificados como los de mayor riesgo de transmisión. Dentro de éste grupo, está asociada al consumo de una pequeña proporción de ALC que pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, y que presenta altos niveles de contaminación.

Un ALC, según el *Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*, se define como un alimento destinado por el productor o el fabricante al consumo humano directo, sin necesidad de cocinado ni ningún otro tratamiento de transformación eficaz, para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos.

Listeria monocytogenes se caracteriza porque puede crecer a temperaturas de refrigeración, pero este crecimiento puede ser evitado o minimizado por las características específicas del alimento como acidez, contenido de sal, contenido de humedad, conservantes, etc. y las condiciones específicas de almacenamiento.

Es crucial que los productores de ALC lleven a cabo las acciones oportunas para controlar, de un lado la contaminación por *Listeria monocytogenes* durante los procesos de fabricación y manipulación, y de otro, su crecimiento en el producto hasta el final de su vida útil.

La vida útil de un alimento se define como un periodo de tiempo en el que un producto sigue siendo seguro y cumple sus especificaciones de calidad en condiciones de almacenamiento y uso previstas. La vida útil determina la fecha de caducidad y se expresa como “fecha de caducidad” o “consumir preferentemente antes de “.

El Reglamento (CE) nº 2073/2005 la define como el período anterior a 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 mercado obligatorio de fechas de los productos alimenticios.

Para los ALC que pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, es difícil predecir con un alto grado de certeza que el nivel será o no, superior a 100 ufc/g durante la vida útil, sobre todo debido a la importante variación en las



condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) en el ámbito doméstico. El impacto en la salud pública dependerá de si se alcanzan los niveles marcadamente superiores a 100 ufc/g (EFSA, 2008).

La definición de un periodo de vida útil realista para los ALC que pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es muy importante para garantizar su seguridad.

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. (UE 2008).

2. OBJETO

Describir un procedimiento que sirva de herramienta a las Autoridades Competentes, para verificar la adecuación de los estudios de vida útil preceptivos en relación con la *Listeria monocytogenes*, elaborados por los operadores de empresas alimentarias dedicadas a la fabricación, envasado y/o reenvasado de Alimentos Listos para el Consumo (ALC).

Los estudios de vida útil objeto de verificación, serán aquellos desarrollados por los responsables de la fabricación de ALC según se recoge en el anexo II del Reglamento (CE) nº 2073/2005.

La aplicación del presente documento puede ser complementaria, en su caso, con la aplicación del documento de AESAN "*Directrices para el muestreo oficial de líneas de producción de alimentos listos para el consumo que pueden plantear riesgo de Listeria monocytogenes y actuaciones consiguientes*", ratificado en Comisión Institucional del 25 de noviembre de 2015.

3. BASE LEGAL Y DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15, de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Guía para la realización de los estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes*, conforme al Reglamento (CE) nº 2073/2005 (SANCO 11510/2013)
- Documento para evaluación de la competencia de laboratorios que realizan tests de desafío en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Versión 2 – 7 de Mayo 2018 (EURL Lm Guidance) (traducción oficiosa al español disponible en la página web de AESAN)



- Documento técnico sobre estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Versión 3- junio 2014- Enmienda 1 de 21 de febrero de 2019 (EURL. Lm Guide)
- Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios (Nº de referencia: AESAN-2011-003)
- Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la verificación de estudios de vida útil en relación a *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (Nº de referencia: AESAN-2019-001)

4. CATEGORÍAS DE ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO

El Capítulo 1 del Anexo I del Reglamento (CE) nº 2073/2005 establece las siguientes categorías de alimentos listos para el consumo:

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de muestreo		Límite		Método analítico de referencia	Fase de la cadena en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimentos listos para el consumo destinados a lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
1.2 Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean 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-1192-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
1.3 Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean 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

La norma contiene cuatro notas aclaratorias (4, 5, 7 y 8) respecto a dichos criterios que deben ser tenidas en cuenta a la hora de aplicarlos:



“(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.

(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*.”

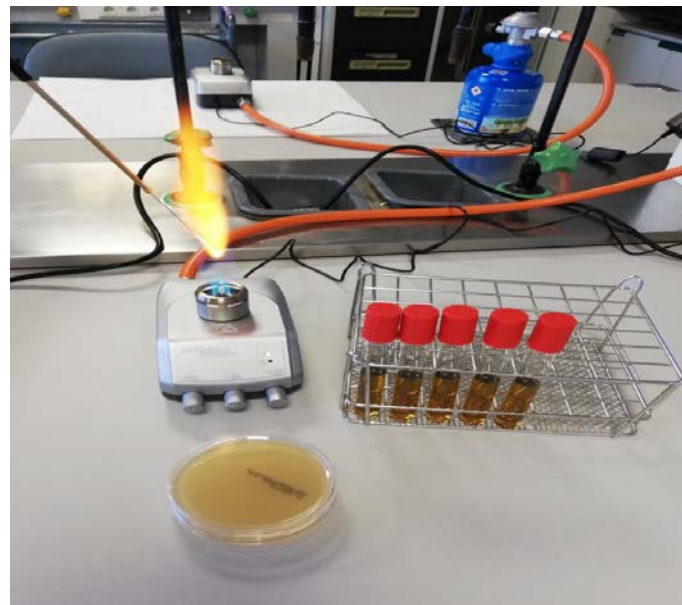
**Los productos congelados, tal como recoge la Guía para la realización de los estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes*, conforme al Reglamento (CE) nº 2073/2005 (SANCO 11510/2013), también se encuentran incluidos en esta categoría. No obstante, si en las especificaciones del operador, en un producto congelado, indican que se puede mantener durante un periodo de tiempo a una temperatura diferente a la congelación, se ha de considerar este tiempo completo a la hora de evaluar los estudios de vida útil.*

Los ALC de la categoría 1.3 que no favorecen el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (y los ALC de la categoría 1.1 destinados a lactantes y a usos

médicos especiales) que se encuentren incluidos en la nota 4, están exentos de realizar controles regulares de éste patógeno en el producto final, pero están obligados a dar garantía del cumplimiento del criterio microbiológico que les aplica respectivamente, por lo que debe quedar debidamente justificado en su procedimiento basado en los principios del APPCC que en el procesado han recibido un tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *Listeria monocytogenes* y que no es posible la recontaminación tras el tratamiento (por ejemplo productos tratados térmicamente en su envase final).

Los estudios de vida útil son necesarios para dar garantías del cumplimiento del criterio de seguridad de *Listeria monocytogenes* basado en el límite 100 ufc/g durante el periodo de comercialización definido por el operador, para todos los ALC contemplados en la categoría 1.3 y a los que aplique de la categoría 1.2.

Saber si el crecimiento puede o no ocurrir en los ALC es importante debido al posible impacto en los consumidores y de los diferentes límites microbiológicos que se aplican, aunque a veces, puede ser difícil confirmar si se produce o no crecimiento. Se considera que un ALC no puede favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes* cuando los niveles del patógeno no se incrementan más de 0.5 log UFC/g durante el periodo de vida útil definido.





Los estudios de vida útil se realizarán conforme a lo establecido en el Anexo II del Reglamento, y consistirán en lo siguiente:

Características del producto y bibliografía científica

- Especificaciones de las características físico-químicas 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, cuando sean necesarios: tendrán en cuenta la variabilidad inherente al producto, los microorganismos en cuestión y las condiciones de transformación y almacenamiento

- Modelos matemáticos de pronóstico establecidos para el alimento de que se trate, utilizando los 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.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el anexo II no describe el procedimiento técnico para realizar los estudios de vida útil.



5. VERIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL.

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) n° 2073/2005:

“Cuando sea necesario, los explotadores de empresas alimentarias responsables de la fabricación del productos 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”.

El **fin de la verificación** de la documentación presentada por el operador es comprobar si es adecuada en cuanto al tipo de estudios (ver anexo III árbol de decisiones que muestra esquemáticamente los pasos para realizar estudios de vida útil) y las condiciones en los que se han llevado a cabo (variabilidad inherente de productos, microorganismos y condiciones de transformación y almacenamiento), y si es suficiente, es decir, si puede demostrar que el producto cumple el criterio microbiológico establecido durante toda su vida útil.

Considerando la posibilidad de colaboración entre empresas que establece el artículo 3 del Reglamento (CE) n° 2073/2005, se pueden dar dos situaciones:

5.A- VERIFICACIÓN DE ESTUDIOS DESARROLLADOS POR LAS PROPIAS EMPRESAS

En éste caso, el estudio de vida útil que va a verificar el control oficial, lo ha realizado íntegramente el fabricante responsable del producto. Según lo establecido en el anexo II del Reglamento (CE) n° 2073/2005, pueden comprender los siguientes tipos de estudios:

1. Características del producto y bibliografía científica.

1.1. Características del producto.

Consiste en describir las especificaciones 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.

1.2. Bibliografía científica

Consiste en consultar la bibliografía científica y los datos de investigación disponibles acerca de los aspectos que caracterizan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en cuestión. Existe la posibilidad de que los alimentos basen su seguridad en la tecnología de los obstáculos (*Liestner 1978*) de manera que la combinación de factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos, además de un efecto aditivo, tenga una acción sinérgica en la conservación del producto final (ver anexo II). Para su valoración se tendrán en



cuenta el conjunto de medidas específicas definidas para el control de *Listeria monocytogenes* en el procedimiento de autocontrol basado en los principios APPCC.

En muchos casos, estos estudios podrían ser suficientes para justificar la vida útil, p.ej. si el pH y/o la actividad de agua de un alimento no permiten el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, la duración de la vida útil concernirá a las características organolépticas del alimento y no la seguridad para este patógeno que no va a crecer.

2. Histórico de datos.

El histórico de datos forma parte de los registros que deben guardar las empresas alimentarias y que en determinados casos, pueden ser suficientes para justificar la vida útil de los alimentos en cuestión.

Se entienden como el conjunto de los resultados de las pruebas realizadas, sobre materias primas, alimentos, superficies y equipos de producción, para comparar con los valores establecidos para los criterios de seguridad alimentaria e higiene del proceso. Se deberán efectuar mediante la toma de muestras, la realización de análisis y la aplicación de acciones correctoras, de conformidad con las características definidas para el criterio que le aplica, tales como: Categoría de alimentos, Microorganismos, Plan de Muestreo, Límites, Método analítico de referencia, Fase en la que se aplica el criterio y Acción en caso de resultados insatisfactorios.

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 del producto.

La autoridad competente puede requerir, en su caso, que éstos datos se complementen con otros estudios complementarios preceptivos.

3. Estudios complementarios.

Estos estudios podrán incluir, entre otras, las tres herramientas relacionadas a continuación, cada una de las cuales tiene ventajas e inconvenientes, por lo que en algunos casos podrá ser necesario que se combinen entre sí.

3.1. Microbiología predictiva. Consiste en la elaboración de modelos matemáticos de pronóstico, establecidos para un alimento concreto, utilizando factores críticos de crecimiento o supervivencia, para tratar de predecir el comportamiento de los microorganismos presentes en el alimento durante su fabricación, almacenamiento y utilización posterior.

3.2. Estudios de durabilidad (o test de envejecimiento). Son pruebas laboratoriales que tratan de evaluar el crecimiento o la supervivencia de los microorganismos que pueda estar presentes en el alimento durante toda la vida



útil, simulando las condiciones razonablemente previsibles de fabricación, distribución, almacenamiento y utilización.

3.3. Ensayos de desafío (challenge test). Son pruebas laboratoriales que tratan de investigar la evolución cuantitativa de un microorganismo, adecuadamente inoculado en un alimento, y de evaluar y cuantificar su crecimiento en diferentes condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles.

Los estudios anteriormente citados tendrán en cuenta la variabilidad inherente al producto, los microorganismos en cuestión y las condiciones de transformación y almacenamiento.

VALORACIÓN OFICIAL DE LOS ESTUDIOS DESARROLLADOS POR LAS PROPIAS EMPRESAS. El resultado de la verificación se podrá considerar:

- **Suficiente**, cuando la empresa proporcione evidencias que demuestren de manera satisfactoria, que el producto cumple el criterio de seguridad de *Listeria monocytogenes* que le aplica durante toda su vida útil.
- **No suficiente**, cuando la empresa no proporcione evidencias que demuestren de manera satisfactoria, que el producto cumple el criterio de seguridad de *Listeria monocytogenes* que le aplica durante toda su vida útil. Podremos encontrar situaciones en las que la documentación se ajuste a los requisitos establecidos en las guías comunitarias de referencia, pero que no sea suficiente para demostrar satisfactoriamente el cumplimiento del criterio a lo largo de la vida útil. Por ejemplo, se podrán verificar estudios en los que se haya aportado bibliografía científica, pero que no concluyen, con cálculos incompletos o erróneos, fuentes científicas no suficientemente contrastadas por lo que no se adecua para demostrar el cumplimiento del criterio específico.

Se tendrá en cuenta que el resultado de la verificación del estudio será aplicable solo para los productos objeto del estudio elaborados por la empresa en sus propias instalaciones.

5.B- VERIFICACIÓN DE ESTUDIOS DESARROLLADOS POR COLABORACIÓN ENTRE EMPRESAS

Una segunda situación se puede dar cuando las empresas opten por justificar la vida útil de sus productos en base a estudios desarrollados por otras empresas y que ya han sido verificados y valorados como suficientes por otra autoridad competente, como por ejemplo:

- Sucursales de la misma empresa
- Asociaciones Sectoriales



- Grupos empresariales
- Franquicias
- Obradores de cadenas alimentarias
- Cadenas de supermercados

Deben ser capaces de demostrar que sus productos se ajustan a las características del producto estudiado con el que se comparan, en todos sus aspectos, y en el caso de que existan diferencias, deberá señalar cómo éstas afectan a la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes*. La empresa puede emplear la bibliografía científica disponible y datos de investigación como consulta. Si la documentación evidencia que los productos y procesos son similares, la empresa podrá utilizar los resultados del estudio para justificar la vida útil que ha establecido.

En estas circunstancias, el control oficial no tendrá que verificar el estudio de vida útil en sí mismo si el operador demuestra que ha sido ya verificado por otra autoridad competente. En este caso lo que tendrá que verificar es que la documentación que presente el operador evidencie la equivalencia de productos y procesos. Para ello, verificará 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 los microorganismos). Si una o varias características difieren, la empresa no podrá usar el estudio sin evaluar el efecto de las diversas características en la supervivencia y el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.
- La formulación del producto debe ser la misma, y en caso contrario, la empresa debe evaluar los efectos de los ingredientes sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.
- El proceso de producción debe ser similar. La empresa debe comparar con detalle las etapas del proceso y debe 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, la empresa tiene evaluar el efecto de las diferencias sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, y
- La microflora asociada incluidos iniciadores, debe ser idéntica, y en caso negativo, tener el mismo efecto sobre *Listeria monocytogenes*.



VALORACIÓN DE LOS ESTUDIOS DESARROLLADOS POR OTRAS EMPRESAS O ASOCIACIONES:

El uso del estudio dependerá de la similitud de los productos y de las condiciones de elaboración; de este modo se podrá considerar:

- **Equivalencia de productos y procesos:** cuando la empresa evidencie de manera satisfactoria que elabora productos similares con procesos similares, y si hubiera diferencias, demuestre mediante documentación o datos de investigación los efectos sobre *Listeria monocytogenes*.
- **No Equivalencia de productos y procesos:** cuando la empresa no evidencie de manera satisfactoria que elabora productos similares con procesos similares, o si habiendo diferencias, no demuestra los efectos sobre *Listeria monocytogenes*.

6. REVISIÓN DE LOS ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL.

El Estudio de Vida Útil deberá ser revisado en su totalidad por los fabricantes responsables de los ALC en diferentes situaciones que podrán ser:

- Repetición de resultados insatisfactorios del criterio de seguridad de *L. monocytogenes* que le aplique, en muestras tanto de control oficial como del autocontrol, cuando en la investigación de las causas se identifique que el periodo de vida útil definido no ha sido idóneo.
- Desarrollo de nuevos alimentos o modificación de alimentos ya existentes.
- Desarrollo de nuevos procesos nuevos o modificación de procesos ya existentes.
- Desarrollo de nuevos envasados o modificación del envasado ya existente.
- Cambio de ingredientes o formulación en los alimentos existentes.
- Existan cambios en las instalaciones o en el equipo de producción que supongan un cambio sustancial en el producto ya existente (procesado, formulación, etc.)



ANEXO I

ESPECIFICACIONES DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL

I.1. Características físico-químicas

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

1. Propiedades intrínsecas:

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

2. Propiedades extrínsecas:

- Vida útil prevista: tiempo y temperatura de conservación
- Sistema de envasado: aire, vacío, atmósfera protectora y porcentaje de los distintos gases que lo integran.
- Condiciones razonablemente previsibles de almacén, transformación y consumo, incluidas las posibilidades de contaminación.

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



I.2. Bibliografía científica

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

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

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

Algunos factores que afectan a la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

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



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

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

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

I.3. 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 basados en los principios APPCC y los planes de autocontroles, incluyendo la calidad de las materias primas, el muestro de superficies de equipos y áreas de procesado 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 basados en los principios APPCC y para verificar la duración de la vida útil, respectivamente).

El histórico de datos es oportuno por las siguientes razones:

- Indica los niveles de *Listeria monocytogenes* que se encuentran en el ambiente de producción, las materias primas y los ALC existentes, bajo las prácticas correctas de higiene y sistemas basados en los principios del APPCC vigentes en las empresas.
- Pueden emplearse para valorar el potencial de crecimiento en ALC similares, con características intrínsecas comparables (pH, aw, microflora, etc.), producidos bajo condiciones prácticamente idénticas, con resultados de análisis de producto al principio y al final de la vida útil.
- Los resultados de análisis de los ALC al principio y al final de la vida útil también se emplean mucho en la práctica para verificar la duración del alimento y confirmar que la vida útil establecida es apropiada cuando se almacena, manipula y utiliza de forma razonablemente previsible.
- Debe usarse para un análisis de tendencias. Cuando los niveles de *Listeria 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 suponen un riesgo para la salud pública. El nivel de confianza aumenta con la cantidad de datos disponibles. Cuantas más unidades del alimento se hayan analizado, más fiable será el histórico de datos.



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

I.4 Estudios complementarios

I.4.a-Microbiología Predictiva (modelos matemáticos)

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

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

Los modelos obtenidos en medios microbiológicos líquidos se usan para describir el posible impacto de varios factores; algunos pueden no describir con precisión el comportamiento microbiano en el alimento, ya que, en un medio líquido, las bacterias ocupan la totalidad del volumen, mientras que en el interior de un alimento sólido, forman unas colonias de volumen limitado; los modelos más robustos han sido validados en alimentos.

Los modelos desarrollados en alimentos pueden describir eficazmente el impacto de las condiciones de conservación en un alimento específico, pero es cuestionable su capacidad para describir el impacto de la variabilidad de las características físico-químicas del alimento o para hacer predicciones en otros alimentos.

También se han desarrollado algunos modelos intermedios, para tratar de superar las limitaciones de estos dos acercamientos principales.

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

Pathogen Modelling Programme, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos

ComBase Predictor, resultado de la colaboración entre Reino Unido, Estados Unidos y Australia.



Algunos de estos modelos se han desarrollado para predecir el comportamiento del microorganismo cuando se conocen las características físico-químicas del alimento (p.ej. pH, actividad de agua, concentraciones de ácidos orgánicos) y la temperatura de conservación. Otros modelos se han desarrollado para predecir el comportamiento de los microorganismos en alimentos particulares, cualesquiera que sean sus condiciones de conservación.

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 *Listeria monocytogenes* en los alimentos:

- Los modelos “crecimiento/no crecimiento”, que predicen la probabilidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos, pueden ayudar a las empresas alimentarias a categorizar sus ALC.
- Los modelos que predicen los tiempos de latencia y la velocidad de crecimiento en alimentos pueden ayudar a las empresas alimentarias a evaluar el crecimiento de *Listeria 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.

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

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

Nota: para una mayor comprensión se recomienda consultar el ejemplo propuesto en el documento en vigor SANCO/11510/2013.

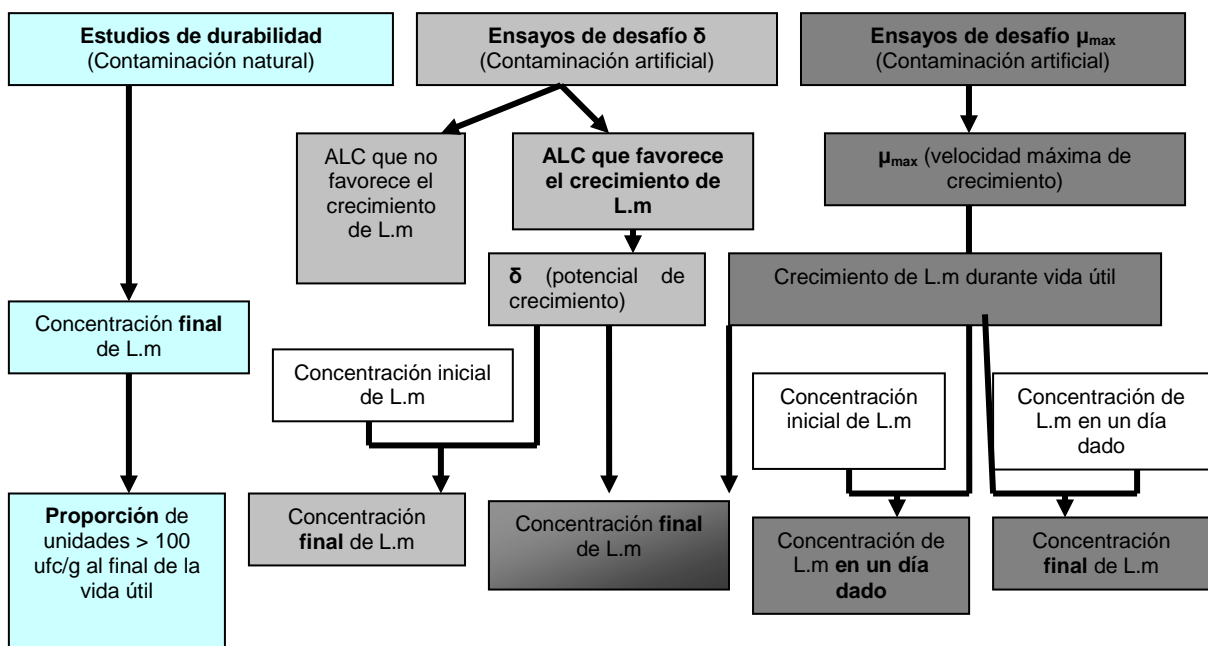
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance_listeria-in-rte-foods_es.pdf

I.4.b-Pruebas de laboratorio específicas

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

Algunas reglas básicas para realizar la elección de la prueba laboratorial más apropiada, son:

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





I-Estudios de durabilidad

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

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 tienen las siguientes limitaciones:

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

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

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



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

Para realizar un estudio de durabilidad se tienen que considerar el método de muestreo, las condiciones de almacenamiento y el método de recuento para *Listeria monocytogenes*.

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

II-Ensayos de desafío

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

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

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

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

II. a-Ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento (δ)

Es un estudio laboratorial que mide el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento contaminado artificialmente, conservado en las condiciones previsibles de transporte, distribución y almacenamiento. Debe reflejar las condiciones reales esperables a lo largo de la cadena del frío, incluyendo las condiciones de conservación desde la producción hasta el consumo.

El potencial de crecimiento (δ) es la diferencia entre el log₁₀ ufc/g al final de la prueba (último día de vida útil) y el log₁₀ ufc/g al principio de la misma (día de la inoculación). 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 *Listeria monocytogenes* en un alimento dado además de:

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

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

- Categorizar un alimento:

Cuando $\delta > 0.5 \log_{10}$ ufc/g, el alimento se clasifica como “Alimento listo para el consumo que puede favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, distinto de alimentos destinados a lactantes y a usos médicos especiales” (categoría 1.2).

Cuando $\delta \leq 0.5 \log_{10}$ ufc/g, el alimento se clasifica como “Alimento listo para el consumo que NO puede favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, distinto de alimentos destinados a lactantes y a usos médicos especiales” (categoría 1.3).

- Cuantificar el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento de la categoría 1.2, de acuerdo con las condiciones definidas como razonablemente previsibles entre la producción y el consumo.



- Calcular la concentración de *Listeria monocytogenes* en el punto de producción, que no conduciría a superar el nivel de 100 ufc/g al final de la vida útil (es decir, fijar un límite intermedio entre ausencia en 25 g y 100 ufc/g)

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

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

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

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

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

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



II.b-Ensayos de desafío para calcular la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max})

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

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

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

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

Por tanto, 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 *Listeria monocytogenes* en un día determinado de la vida útil, si se conoce la concentración inicial.
- Estimar la máxima concentración permisible de *Listeria 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).

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



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

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

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



ANEXO II

TECNOLOGÍA DE LOS OBSTÁCULOS O DE BARRERAS

La seguridad y la estabilidad microbiana de la mayoría de los alimentos se basan en una combinación de varios factores (obstáculos o barreras), que es inherente a cada alimento en particular, según su intensidad o calidad.

La tecnología de los obstáculos ha demostrado ser útil tanto para la optimización de alimentos tradicionales como para el desarrollo de nuevos productos. (Leistner, 2000)

Homeostasis y la tecnología de los obstáculos: la homeostasis es la tendencia a la estabilidad de los microorganismos. Si éste equilibrio interno se ve perturbado por factores de conservación (obstáculos) en los alimentos, se impide el crecimiento de los microorganismos y se prolonga la fase lag o incluso mueren antes de que se restablezca la homeostasis. La conservación de los alimentos se consigue por alterar la homeostasis en los microorganismos presentes, de forma temporal o permanente.

En los alimentos que fundamentan su conservación en la tecnología de los obstáculos, existe la posibilidad de que los diferentes obstáculos no sólo tengan un efecto aditivo sino incluso pueden actuar sinérgicamente (Leistner, 1978).

Este efecto sinérgico se produce cuando los obstáculos actúan sobre diferentes objetivos del patógeno dentro y fuera de la célula (por ejemplo membrana de la célula, ADN, sistemas enzimáticos, etc) alterando la homeostasis en varios aspectos.

En términos prácticos, esta acción sinérgica puede significar que puede ser más eficaz utilizar diferentes “barreras” en pequeñas cantidades en un alimento que sólo una sola “barrera” en cantidades más grandes (Leistner, 1994)

Los obstáculos más importantes que se usan comúnmente en la conservación de alimentos son: alta temperatura (valor F), baja temperatura (valor t), la actividad de agua (a_w), la acidez (pH), potencial redox (Eh), los microorganismos competitivos (como bacterias ácido lácticas) y conservantes (como nitritos, sorbatos o sulfitos).

Hasta ahora se han identificado más de 40 obstáculos de uso potencial para mejorar la estabilidad y/o la calidad de alimentos de origen animal o vegetal.



OBSTACULOS FISICOS		OBSTACULOS FÍSICO- QUÍMICOS				BIOLOGICOS
tratamiento térmico	temperatura de almacenamiento	aw	pH	potencial redox	sal	flora competitiva
radiación	energía electromagnética	nitrito	nitrato	dióxido de carbono	oxígeno	
Inactivación fotodinámica	ultra alta presión	ozono	ácidos orgánicos	ácido ascórbico	sulfito	cultivos iniciadores
ultrasonificación	envasado (activo, al vacío)	humo	fosfatos	glucono-lactona	fenoles	
envasado en atmósferas modificadas	almacenado en atmósferas modificadas	etanol	productos de la reacción de Maillard	hierbas y especias	lactoperoxidasa	bacteriocinas
almacenado en atmósferas controladas	almacenamiento hipobárico	lisozima				antibióticos
envasado aséptico						



ANEXO III-ÁRBOL DE DECISIONES





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 *Listeria monocytogenes* a un nivel aceptable antes del consumo. En este caso, al alimento no le es de aplicación ningún criterio específico en relación con *Listeria 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 *Listeria 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 *Listeria monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (p.ej. 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 *Listeria monocytogenes*. La seguridad alimentaria se gestiona vigilando los PCC del proceso de producción (p.ej. tratamiento térmico). Las pruebas de *Listeria 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 *Listeria monocytogenes* (ausencia en 25 g, n = 10, c = 0).

Pregunta 4:

Si la empresa tiene evidencias científicas de que *Listeria 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 $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- 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 *Listeria 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.ej. vigilancia de los factores intrínsecos del producto, como a_w y pH). El control del nivel de contaminación inicial de materias primas e ingredientes, y las PCH (contaminación cruzada, etc.) tienen que garantizar que el nivel de *Listeria monocytogenes* no excederá las 100 ufc/g durante la vida útil del producto.

Preguntas 5 y 6:

Cuando no pueda excluirse el crecimiento de *Listeria 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 Comunitaria y haya datos adecuados de que el alimento no superará las 100 ufc/g de *Listeria 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 *Listeria 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 *Listeria monocytogenes*, el ajuste de factores intrínsecos del producto final, tratamiento térmico adicional, etc.

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



ANEXO IV

LISTADOS DE VERIFICACIÓN

A. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA		SÍ	NO
Se usa un modelo predictivo adecuado para el alimento en estudio			
Se utilizan factores críticos de crecimiento o supervivencia aplicables a los microorganismos en cuestión presentes en el producto			
Se usan modelos para predecir tiempo de latencia y velocidad de crecimiento para evaluar el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en el alimento (*)			
Se considera la variabilidad de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> , del procesado, del alimento y de las condiciones de conservación			
¿El Estudio de Microbiología Predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple con el criterio durante toda su vida útil?			
Observaciones:			

B. ESTUDIOS DE DURABILIDAD.		SÍ	NO
Se realiza un muestreo aleatorio simple (*)			
El muestreo se repite para diferentes lotes a fin de tener en cuenta su variabilidad			
Se contemplan:	las condiciones de tiempo y temperatura “razonablemente previsibles		
	las condiciones de transporte		
	las condiciones de distribución, y		
	empleo por el consumidor final		
Se analizan usando los métodos de referencia o alternativos			
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			



B. ESTUDIOS DE DURABILIDAD.		SÍ	NO
Se calcula el intervalo de confianza asociado a esta proporción (*)			
¿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?			
Observaciones:			

C. ENSAYOS DE DESAFIO.		SÍ	NO
Se han realizado ensayos de desafío para valorar la capacidad de un microorganismo para crecer en el alimento (potencial de crecimiento δ)			
Se han realizado ensayos de desafío para estimar los parámetros de crecimiento de un microorganismo (tasa de crecimiento máximo μ_{max}) (*)			
Se han contemplado las condiciones razonablemente previsibles de:	transporte		
	distribución		
	almacenamiento, y		
	consumo		
Se describen distintos lotes a analizar al objeto de contemplar la heterogeneidad del producto; las pruebas se realizan sobre varias unidades por cada lote			
Se describe (*):	la elección de la/s cepa/s inoculadas;		
	el precultivo;		
	la concentración inicial, y		
	la distribución del inóculo		
Se analizan usando los métodos de referencia o alternativos			
Se incluyen los cálculos realizados para valorar el potencial de crecimiento o la velocidad máxima de crecimiento en los escenarios contemplados (*)			



C. ENSAYOS DE DESAFIO.		SÍ	NO
¿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?			
Observaciones:			

III. HISTÓRICO DE DATOS (*)		SÍ	NO
Se han obtenido siguiendo el plan de muestreo reglamentario			
Se han analizado usando los métodos de referencia o alternativos			
Se aplica el criterio en la fase establecida			
Los resultados de los controles de las materias primas demuestran su calidad			
Los niveles de <i>Listeria monocytogenes</i> en el alimento en el día de fabricación o en el día final de su vida útil son consistentemente bajos o ausentes, verificando la eficacia de los controles internos			
Se aplican acciones correctoras ante resultados insatisfactorios			
Los resultados de los muestreos de superficies demuestran la eficacia del sistema de limpieza y desinfecciones			
El número de análisis realizado se considera suficiente para dar fiabilidad al histórico			
¿El Histórico de Datos aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple con el criterio durante toda su vida útil?			
Observaciones:			



IV. ESTUDIOS REALIZADOS POR OTRAS EMPRESAS		SÍ	NO
Los productos tienen las mismas características (pH, aw, microflora asociada), o si difiere se han tenido en cuenta los efectos sobre el crecimiento del microorganismo (*)			
La formulación (ingredientes como aditivos, sal, etc.) del producto es igual, o si difiere se han tenido en cuenta los efectos sobre el crecimiento del microorganismo (*)			
El proceso de producción es similar, o si difiere se han tenido en cuenta los efectos sobre el crecimiento del microorganismo (*)			
Las condiciones de conservación (tiempo, temperatura y envasado) son similares, o si difieren se han tenido en cuenta los efectos sobre el crecimiento del microorganismo (*)			
La vida útil es similar, o si difiere se han tenido en cuenta los efectos sobre el crecimiento del microorganismo (*)			
¿La documentación presentada por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria la equivalencia de producto y procesos? (*)			
Observaciones:			

*Recomendación de la Comisión Europea.



ANEXO V

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

EJEMPLO 1. CARACTERÍSTICAS DEL ALIMENTO – ENSALADILLA RUSA

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica dos tipos de ensaladilla rusa lista para el consumo con las características que se indican en las tablas.

¿Se puede concluir que *L. monocytogenes* no puede crecer en ninguno de los dos alimentos?

Ensaladilla rusa 1	
pH (valor medio)	4,20
Desviación estándar	0,056
Nº de muestras	1000

Ensaladilla rusa 2	
pH (valor medio)	4,01
Desviación estándar	0,537
Nº de muestras	1000

Aplicación del árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SÍ, por lo tanto se puede clasificar como **Alimento Listo para el Consumo**

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

NO

3. ¿El producto está destinado a lactantes o a usos médicos especiales?

NO

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

¿?

Resolución de la primera parte del ejemplo.

La ensaladilla rusa 1 presenta un pH medio de 4,20 y una variabilidad pequeña. Los parámetros estadísticos presentados permiten calcular* que un porcentaje superior al 99,9% de las unidades tendría un pH menor que 4,4 por lo que se consideraría que 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.

* obtenido a partir de la calculadora desarrollada por la red BIOQUORA disponible en internet

Respuestas al listado de verificación.

No existe un apartado específico de características del alimento en los listados de verificación.

Respuesta al árbol de decisiones en la primera parte del ejemplo.

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con $pH \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $pH \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

SÍ, por lo tanto se puede concluir que *L. monocytogenes* NO puede crecer en este alimento.



Límite de 100 ufc/g en productos comercializados durante vida útil.

De acuerdo con los procedimientos basados en APPCC, la vigilancia debería centrarse en los PCC fijados (p.ej. factores intrínsecos del producto, nivel de contaminación de ingredientes, condiciones de procesado específicas). Verificación de acuerdo con PCH y APPCC.

Conclusión de la primera parte del ejemplo.

Así pues, se concluye que la empresa ha proporcionado evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria de *Listeria monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil, y el resultado de la verificación es **SUFICIENTE**.

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la primera parte del ejemplo

El alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.3 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil



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 producido
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

“(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.

(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*.”

Resolución de la segunda parte del ejemplo.

La ensaladilla rusa 2 presenta un pH medio inferior, de 4,01 pero una mayor variabilidad. Los parámetros estadísticos presentados permiten calcular* que, en este caso, un 23,4% de las unidades tendría un pH superior a 4,4, por lo que se consideraría que si permite el crecimiento de *L. monocytogenes* y sería necesario realizar estudios complementarios de vida útil para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil.

* obtenido a partir de la calculadora desarrollada por la red BIOQUORA disponible en internet



Respuesta al árbol de decisiones en la segunda parte del ejemplo.

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
 - Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
 - Productos con vida útil inferior a 5 días
 - Productos congelados
- Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

NO, por lo tanto se puede concluir que *L. monocytogenes* puede crecer en este alimento.

Sin perjuicio de las posibles medidas a tomar con los productos comercializados, el alimento debe cumplir con el límite de ausencia en 25 g antes de que haya salido del productor. La evaluación de la vida útil es insuficiente y el productor no puede demostrar que no se superarán los 100 ufc/g al final de la misma. Si no se sabe si los productos son seguros, no se deberían comercializar. El productor debe asegurar que no hay contaminación por *L. monocytogenes* a partir de las materias primas o el ambiente de producción. Revisión y mejora del proceso de producción, de acuerdo con los principios APPCC.

Conclusión de la segunda parte del ejemplo.

Así pues, se concluye que la empresa no ha proporcionado evidencias que demuestren de manera satisfactoria que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria de *Listeria monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil, y el resultado de la verificación es **NO SUFICIENTE**.



Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005 en la segunda parte del ejemplo

En este caso, el alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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 producido
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

“(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.

(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*.”

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

Se sugiere a la empresa que realice estudios complementarios de vida útil y/o aporte el histórico de datos.



EJEMPLO 2. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA – QUESO FRESCO VACA

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica un queso fresco hecho a partir de leche de vaca pasteurizada con las características que se indican en la tabla.

Vida útil declarada	7 días
Temperatura de conservación	1-5°C
pH	6,2-6,7
a_w	0,994
Sal	1,25%

Este se distribuye y comercializa bien entero o bien en porciones recubierto de un film alimentario.

Aplicación del árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SÍ, por lo tanto se puede clasificar como **Alimento Listo para el Consumo**

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

NO

3. ¿El producto está destinado a lactantes o a usos médicos especiales?

NO

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

NO, por lo tanto se puede concluir que *L. monocytogenes* puede crecer en este alimento.

5. ¿Se ha realizado una microbiología predictiva (modelos) adecuada?

¿?



Resolución del ejemplo.

De acuerdo a los registros de la empresa, que realiza el análisis del producto recién terminado y de las superficies de trabajo y corte, en ninguno de los lotes de queso analizados en los últimos 5 años semestralmente se ha observado la presencia de *L. monocytogenes* y tan solo en una ocasión se detectó la presencia en las superficies de corte. La empresa en su momento revisó y mejoró el proceso de producción, de acuerdo con los principios APPCC y revisión de la vida útil, no habiéndose detectado de nuevo la presencia de *L. monocytogenes* en los análisis posteriores.

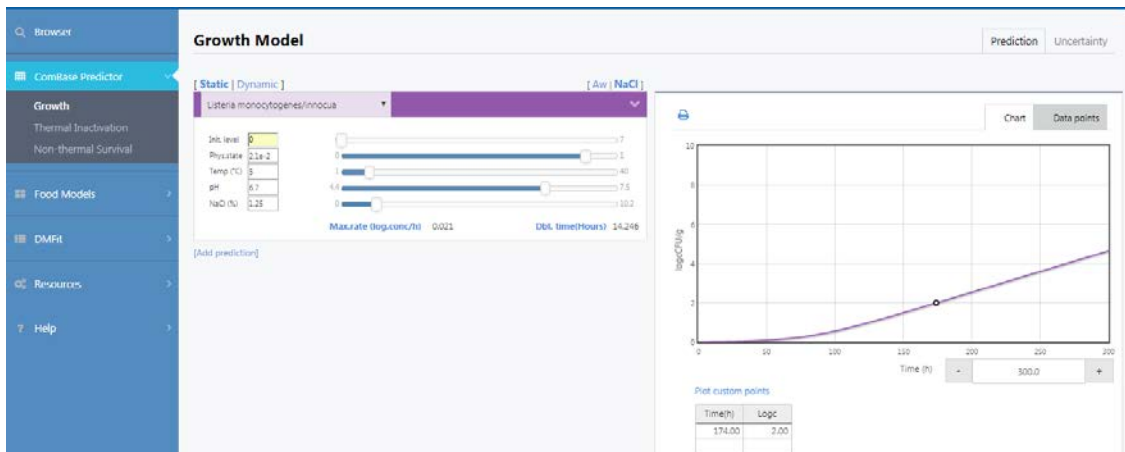
En cualquier caso, las características del producto (detalladas en la tabla) y sus condiciones de conservación permitirían el crecimiento de *L. monocytogenes*, como así asume la empresa.

Por ello, la empresa presentó el siguiente estudio de microbiología predictiva para justificar la validez de la vida útil asignada. Para ello, utilizó el programa COMBASE, utilizando los siguientes parámetros:

- Modelo: Estático
- Microorganismo: *L. monocytogenes/innocua*
- Nº inicial: 0 log UFC/g
- Condiciones de almacenamiento más desfavorables de pH y temperatura: pH 6,7 y 5°C.
- Concentración de NaCl: 1,25 %

- Estado fisiológico de las células: El prefijado por COMBASE para este microorganismo: $2.1e^{-2}$

De acuerdo a los datos obtenidos con el modelo integrado en COMBASE, en estas condiciones, alcanzar las 100 UFC/g, que es el máximo permitido para este tipo de productos requeriría de 174 horas, o lo que es lo mismo, 7,25 días. Esto concuerda razonablemente con lo declarado por la empresa, pero es importante tener en cuenta que, por una parte el número inicial en este caso es de 1 UFC/g mientras que el histórico indica que la contaminación es mucho más baja (ausencia en 25 g), lo que da un margen de seguridad de alrededor de un ciclo logarítmico extra y, por otra parte, que el estado fisiológico (α) de las células de *L. monocytogenes* sería "peor" que el utilizado en el modelo ya que dado que la leche está pasteurizada, estas serían resultado de la contaminación ambiental y, por lo tanto, no estarían aclimatadas o adaptadas a las condiciones de crecimiento finales por lo que, previsiblemente, la fase lag sería más larga que la predicha en el modelo y, por lo tanto, el tiempo para alcanzar esas 100 UFC/g también superior.



Los resultados arriba indicados sugieren que la vida útil estimada por la empresa sería razonablemente precisa si se cumplieran las condiciones de conservación indicadas por la misma ($< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, y a pesar de todo lo indicado anteriormente este estudio no tiene en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso del alimento. La empresa podría justificar una temperatura de almacenamiento de 5°C en sus cámaras -si aporta la documentación pertinente- para la primera parte de la vida útil pero, para el resto de la vida útil, incluidos el transporte, distribución en puntos de venta y almacenamiento por parte del consumidor es muy difícil que se mantenga esta temperatura. En este caso, si se desconocen las temperaturas reales de almacenamiento del producto en cuestión, los explotadores de empresas alimentarias deberían aplicar las temperaturas de almacenamiento indicadas en la guía publicada por el laboratorio europeo de referencia para *L. monocytogenes*. En el caso de utilizar esas temperaturas, el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta las 100 UFC/g se produciría antes de los 7 días.

Respuestas al listado de verificación.

En relación al listado de verificación estaríamos en la siguiente situación:

A. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	SÍ	NO
<p>Se usa un modelo predictivo adecuado (Combase, Pathogen Modelling Programme, MicroHibro...)</p> <p>Para responder se puede consultar el listado de herramientas contrastadas disponibles para microbiología predictiva en la página web del Instituto Federal Alemán para el Análisis de Riesgos (BfR): https://foodrisklabs.bfr.bund.de/microbial-modeling-exchange-wiki/</p>	x	
<p>El modelo predictivo utilizado incluye entre sus parámetros aquellas características del alimento en estudio que influyen en el crecimiento o supervivencia del microorganismo en cuestión</p> <p>Para responder se puede consultar el apartado 1 del anexo I del presente Documento</p>	x	
<p>Se usan modelos para predecir tiempo de latencia y velocidad de crecimiento para evaluar el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en el alimento (*)</p>	x*	



Para responder se puede consultar el apartado 4.1 del anexo I del presente Documento y la guía SANCO 11510/2013			
Se considera la variabilidad de las características del alimento y de las condiciones de procesado y de conservación			x
¿El Estudio de Microbiología Predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple con el criterio durante toda su vida útil?			x
Observaciones:	*Aunque es preciso indicar que es difícil predecir el valor de latencia ya que depende en gran medida del estado fisiológico de las células de <i>L. monocytogenes</i> .		

Respuesta al árbol de decisiones.

5. ¿Se ha realizado una microbiología predictiva (modelos) adecuada?

→ **NO** →

Sin perjuicio de las posibles medidas a tomar con los productos comercializados, el alimento debe cumplir con el límite de ausencia en 25 g antes de que haya salido del productor. La evaluación de la vida útil es insuficiente y el productor no puede demostrar que no se superarán los 100 ufc/g al final de la misma. Si no se sabe si los productos son seguros, no se deberían comercializar. El productor debe asegurar que no hay contaminación por *L. monocytogenes* a partir de las materias primas o el ambiente de producción. Revisión y mejora del proceso de producción, de acuerdo con los principios APPCC.

Conclusión.

Así pues, se concluye que la empresa no ha proporcionado evidencias que demuestren de manera satisfactoria que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria de *Listeria monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil, y el resultado de la verificación es NO SUFICIENTE.

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005

El alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil



médicos especiales						
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 producido
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

“(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.

(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 $pH \leq 4,4$ 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*.”

Alternativas para conseguir una valoración suficiente

Se sugieren las siguientes alternativas:



- 1) Subsanan las deficiencias observadas en el estudio de vida útil mediante Microbiología Predictiva. Dos escenarios posibles:
 - Que los nuevos datos soporten que la vida útil declarada por la empresa es correcta → Vida útil OK.
 - Que los nuevos datos indiquen que la vida útil sería inferior a 7 días → Habría dos alternativas:
 - Reducir/recalcular la vida útil que asigna a su producto.
 - Determinar la vida útil del producto mediante o bien el estudio del histórico de datos o a través de ensayos de desafío (en este caso no se recomiendan los estudios de durabilidad pues el número inicial de *L. monocytogenes* es difícil –sino imposible– de determinar).
- 2) Directamente determinar la vida útil de su producto a través de ensayos de desafío o justificarla a través del histórico de datos.
- 3) Comercializar su producto con una vida útil inferior a los 5 días para lo que no se requeriría de estudios ni ensayos adicionales (ver pregunta 4 del árbol de decisiones).



EJEMPLO 3. ENSAYO DE DESAFÍO PARA DETERMINACIÓN DE POTENCIAL DE CRECIMIENTO – PATÉ

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica paté listo para el consumo con las características de pH y actividad del agua que se indican en la tabla.

Paté	
pH (valor medio)	6,20
Aw (valor medio)	0,97

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SÍ, por lo tanto se puede clasificar como **Alimento Listo para el Consumo**

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

NO

3. ¿El producto está destinado a lactantes o a usos médicos especiales?

NO

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

NO

El paté presenta un pH medio de 6,20 y una actividad del agua media de 0,97, por lo que no hay evidencias de que *L. monocytogenes* no pueda crecer en el producto, teniendo en cuenta sus características físico-químicas.

5. ¿Se ha realizado una microbiología predictiva (modelos) adecuada?

NO, la empresa no presenta datos al respecto

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

NO, la empresa no presenta datos al respecto

7. ¿Se ha realizado un ensayo de desafío según se describe en la Guía?



Resolución del ejemplo.

La empresa presenta los resultados de un ensayo de desafío llevado a cabo en un laboratorio de análisis de alimentos. El ensayo de desafío presenta las siguientes características:

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de paté.

De acuerdo a la guía técnica, en casos en que utilizando herramientas de microbiología predictiva se demuestre (i) que la probabilidad de que *L. monocytogenes* crezca en el producto es baja (<10%) y (ii) que hay una baja variabilidad en características físico-químicas (pH y *A_w*) entre lotes, se podría analizar un único lote de producción. Alternativamente, es necesario analizar al menos tres lotes de producción, como se ha realizado en este caso.

- **Cepas de *L. monocytogenes*:** se utilizó un cóctel de tres cepas distintas de *L. monocytogenes* (una de ellas provenía de la colección del laboratorio europeo de referencia para *L. monocytogenes*; las otras dos eran cepas propias del laboratorio donde se ejecutó en ensayo de desafío y provenían de una muestra de queso y de una muestra ambiental de una industria alimentaria, respectivamente).

De acuerdo a la guía técnica, es necesario utilizar un cóctel con al menos dos cepas distintas de *L. monocytogenes*. Una de ellas tiene que ser una cepa con características de crecimiento bien conocidas (el laboratorio europeo de referencia para *L. monocytogenes* ha establecido una colección al respecto). La(s) otra(s) se puede(n) elegir libremente. En este caso se cumplen estos requisitos mínimos, en cuanto a la elección y número de cepas de *L. monocytogenes*.

- **Preparación del inóculo:** cada cepa de *L. monocytogenes* fue, en primer lugar, crecida en caldo BHI a 37°C durante 24 horas y, posteriormente, ese cultivo bacteriano fue utilizado para preparar un segundo cultivo en caldo BHI, que fue incubado a 10°C durante 5 días. Posteriormente, los cultivos de las tres cepas de *L. monocytogenes* fueron mezclados en cantidades iguales, para obtener el cóctel a utilizar para la inoculación de los lotes de paté.

De acuerdo a la guía técnica, es necesario realizar dos cultivos sucesivos de cada cepa, el primero en un medio de laboratorio no selectivo, como caldo TSB o caldo BHI, a 37°C durante el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (16 – 24 horas), y el segundo en un medio de laboratorio no selectivo a una temperatura cercana a la temperatura habitual de almacenamiento del producto (en productos listos para el consumo, habitualmente almacenados a refrigeración, deben utilizarse temperaturas



bajas, como por ejemplo 7°C o 10°C) durante el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente se deben mezclar en cantidades iguales los cultivos bacterianos de cada una de las cepas que conforman el cóctel. En este caso se cumplen estos requisitos mínimos, en cuanto a la preparación del inóculo.

- **Inoculación de la muestra:** Se realizaron varias diluciones del cóctel de cepas de *L. monocytogenes* en diluyente de recuperación máxima. Posteriormente, se realizó una inoculación en superficie. El volumen de inóculo empleado fue un 1% (p/v) de la masa de las muestras de paté. El inóculo fue extendido en la superficie del producto con un asa de siembra estéril. Posteriormente, las unidades de muestra inoculadas fueron mantenidas en la cabina de flujo laminar durante 15 minutos hasta su completo secado superficial y se envasaron a vacío. El nivel final de contaminación fue de $1,84 \pm 0,07$ log UFC/g.

De acuerdo a la guía técnica, se pueden utilizar distintos métodos de inoculación, dependiendo del tipo de alimento. O bien el alimento se retira de su envase, se inocula y se vuelve a envasar en condiciones similares, o bien el alimento se mantiene en su envase y se inocula por medio de un septo para mantener las condiciones atmosféricas del envase. En el primer caso, la inoculación puede realizarse en profundidad, en alimentos considerados homogéneos (por ejemplo, alimentos molidos) o preparados mezclando varios materiales (por ejemplo, ensaladas mixtas), o en superficie, para simular la contaminación de una parte específica durante el procesado (por ejemplo, productos contaminados durante el loncheado o envasado). En cualquier caso, el volumen de inoculación nunca debe superar el 1% (p/v) de la masa de producto, para no alterar significativamente las características físico-químicas del mismo, y el nivel de inoculación debe ser aproximadamente 100 UFC/g (es decir, aproximadamente 2 log UFC/g). En este caso se cumplen estos requisitos mínimos, en cuanto a la inoculación de las muestras.

- **Almacenamiento de muestras:** las muestras fueron almacenadas a 8°C durante 14 días (vida útil declarada del producto). El laboratorio de análisis presenta registros de temperatura en la empresa y datos del país, tanto a nivel de venta como a nivel doméstico, que apoyan la utilización de esa temperatura de almacenamiento.

De acuerdo a la guía técnica, la duración del ensayo de desafío debe ser la misma que la vida útil declarada del producto. Por otro lado, a la hora de seleccionar la temperatura de almacenamiento, se pueden utilizar registros de temperatura de la propia empresa y datos nacionales de temperatura media a nivel de venta y nivel doméstico. Si esta información no está disponible, se utilizará por defecto el siguiente perfil de tiempo y temperatura de almacenamiento: 7°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento en la empresa productora), 7°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento en el punto de venta) y 12°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento a nivel doméstico). En este



caso, se utilizó una temperatura de 8°C durante toda la vida útil declarada del producto, ya que se disponía de registros de temperatura en la empresa y datos del país, tanto a nivel de venta como a nivel doméstico y, por tanto, se cumplen los requisitos mínimos de la guía técnica, en cuanto al almacenamiento de las muestras.

- **Análisis de muestras:** se realizó una enumeración de *L. monocytogenes* al inicio del ensayo de desafío, al final de la vida útil declarada y en un punto intermedio del ensayo. El laboratorio estaba acreditado para la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos empleando el método EN ISO 17025. También se determinaron en esos tres puntos de muestreo el pH, la Aw y se enumeró la flora aerobia mesófila.

De acuerdo a la guía técnica, el análisis microbiológico y de características físico-químicas (al menos pH y Aw) del producto debe realizarse al menos al inicio del ensayo de desafío y al final del mismo (vida útil declarada), aunque es aconsejable realizar análisis intermedios. El laboratorio de análisis preferentemente debe estar acreditado para la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos. Es aconsejable analizar también la microbiota asociada al producto (por ejemplo, mediante la enumeración de la flora aerobia mesófila o de bacterias ácido-lácticas). En este caso se cumplen estos requisitos mínimos, en cuanto al análisis microbiológico y físico-químico de las muestras.

- **Cálculo del potencial de crecimiento:** el potencial de crecimiento fue calculado como la diferencia entre la mediana de los recuentos de *L. monocytogenes* al final del ensayo de desafío y la mediana de los recuentos de *L. monocytogenes* al comienzo del mismo. Se calculó el potencial de crecimiento para cada uno de los lotes y el mayor de los valores, que representa el peor escenario posible, fue considerado el potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* en el paté objeto de estudio. El potencial de crecimiento fue en este caso 4,87 log UFC/g.

De acuerdo a la guía técnica, si el potencial de crecimiento, calculado como la diferencia entre la mediana de los recuentos de *L. monocytogenes* al final del ensayo de desafío y la mediana de los recuentos de *L. monocytogenes* al comienzo del mismo, es superior a 0,5 log UFC/g se considera que *L. monocytogenes* es capaz de crecer en el producto. En el caso del paté, el potencial de crecimiento en el peor escenario posible fue de 4,87 log UFC/g.

Respuestas al listado de verificación.

En relación al listado de verificación estaríamos en la siguiente situación:

C. ENSAYOS DE DESAFIO (**).	SÍ	NO
Se han realizado ensayos de desafío para valorar la capacidad de un microorganismo para crecer en el alimento (potencial de crecimiento δ)	x	



C. ENSAYOS DE DESAFÍO (**).		SÍ	NO
En los ensayos de desafío para valorar el potencial de crecimiento, se han contemplado las condiciones razonablemente previsibles de:	transporte	X	
	distribución	X	
	almacenamiento, y	X	
	consumo	X	
Se han realizado ensayos de desafío para estimar los parámetros de crecimiento de un microorganismo (tasa de crecimiento máximo μ_{max}) (*)			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	
Se describe (*):	la elección de la/s cepa/s inoculadas;	X	
	el precultivo;	X	
	la concentración inicial, y	X	
	la distribución del inóculo	X	
El laboratorio que ha realizado los análisis cumple los requisitos mínimos exigibles a este tipo de laboratorios <small>Para responder se puede consultar el documento guía para evaluar la competencia de los laboratorios que realizan estudios de vida útil en relación con <i>L. monocytogenes</i> (EUR Lm Guidance document, 2018).</small>		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
Observaciones:	*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		

** Para responder a las cuestiones planteadas en este bloque se puede consultar el apartado 4.2.2 del anexo I del presente Documento y la guía técnica del EURL *Lm* de 2014

Respuesta al árbol de decisiones.

7. ¿Se ha realizado un ensayo de desafío según se describe en la Guía?

→ SI → Hay potencial de crecimiento.



El productor debe asegurar que no hay contaminación por *L. monocytogenes* a partir de las materias primas o el ambiente de producción. Además, la duración de la vida útil debe ajustarse para no superar los 100 ufc/g al final. La vida útil de los productos depende del factor de crecimiento y del nivel posible de contaminación por *L. monocytogenes* en el producto.

Conclusión

Se concluye que la empresa no ha proporcionado evidencias que demuestren de manera satisfactoria que el producto no permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, y el resultado de la verificación es **NO SUFICIENTE**.

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005 en la segunda parte del ejemplo

En este caso, el alimento también se clasificaría dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005, pero le aplicaría otro criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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 producido
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

“(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.

(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.



EJEMPLO 4. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL: CATEGORÍA DE ALIMENTO – ELABORADO CÁRNICO

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica un elaborado cárnico cocinado listo para el consumo con pH y a_w no limitantes para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. El cocinado del producto se realiza mediante inmersión en agua caliente (100 min a 58°C) del producto envasado al vacío.

Aplicación del árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SÍ, por lo tanto se puede clasificar como **Alimento Listo para el Consumo**

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

¿?

Resolución del ejemplo.

Surge la duda de si el cocinado del producto puede eliminar *L. monocytogenes* en caso de estar presente en el producto.

¿Qué referencias tenemos para evaluar el tratamiento?

- “Documento de orientación Apartado 2 del anexo I” (ver también la “Guía Sanco 1628/2008: GUIDANCE DOCUMENT on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) Nº 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs”) indica que:

Tratamiento térmico durante la elaboración	Se requiere una combinación de temperatura/tiempo de 70° C durante 2 minutos para una reducción D-6 (es decir, 106 o de 6 decimales) del número de células de <i>Listeria monocytogenes</i> . Otras combinaciones tiempo/temperatura también podrían lograr la misma reducción.
--	---

- “National Advisory committee on Microbiological criteria for foods (NACMCF). Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization (2004)”: Describe como verificar la eficacia de nuevas tecnologías de conservación (Microondas, HPP...) y en su “Parameters for determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols (2009)”: Indica el número de reducciones logarítmicas del microorganismo patógeno diana que debe conseguir un tratamiento (usualmente entre 5-7 log).



- “European chilled food federation (ECFF): Recommendations for the production of prepackaged chilled Food (2006)”. Indica 6 reducciones log de *L. monocytogenes* asumiendo 2 min a 70°C e indica tabla de tiempo y temperaturas equivalentes, teniendo en cuenta una Tª de referencia de 70°C y un valor z = 7,5°C.
- “Campden BRI “BRC Global Standard for Food Safety, Issue 8 Clause 5.2.5. “Cooking (heating) instructions validation (2019)”, indica 6 reducciones logarítmicas de *L. monocytogenes*, para lo que se requiere una combinación de tiempo/temperatura de 2 min a 70°C e incluye una tabla de tiempos y temperaturas equivalentes, teniendo en cuenta una temperatura de referencia de 70°C y un valor z = 7.5°C. También describe premisas a la hora de validar un tratamiento en hornos, microondas, cazuelas, etc., y las peculiaridades técnicas de cada tipo.

¿Cómo evaluamos si el tratamiento cumple las citadas referencias?

Se lleva a cabo un Estudio de penetración de calor para decidir si el calentamiento llega a 2 minutos a 70°C durante el proceso de calentamiento que indica el productor, de acuerdo a

$$F_{70}^{7,5} = 10^{\frac{70-T}{7,5}} ; F = \sum_0^i F_0$$

donde T es la temperatura en el interior del producto 70°C es la temperatura de referencia y z = 7,5°C

Los resultados obtenidos fueron:

Se obtiene un tratamiento térmico equivalente a 2,5 minutos a 70°C, que asegura la inactivación de 6 ciclos logarítmicos de *Listeria monocytogenes*.

Además, la empresa corrobora sus resultados con un ensayo de desafío de inactivación, con las siguientes características:

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos.
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** se utilizó un cóctel de tres cepas distintas de *L. monocytogenes* (dos de ellas provenía de la colección del laboratorio europeo de referencia para *L. monocytogenes*, de características conocidas; la otra era una cepa propia del laboratorio donde se ejecutó en ensayo de desafío, aislada de un producto cárnico).
- **Preparación del inóculo:** cada cepa de *L. monocytogenes* fue crecida en un medio de laboratorio no selectivo a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, los cultivos de las tres cepas de *L. monocytogenes* fueron mezclados en cantidades iguales, para obtener el cóctel a utilizar para la inoculación de los lotes.
- **Inoculación de la muestra:** Se inocularon muestras de 100 g del elaborado cárnico con el cultivo mixto de las tres cepas a una concentración aproximada de $1,0 \times 10^6$ UFC/g.
- **Aplicación del tratamiento de cocción:** las muestras inoculadas se envasaron a vacío y se llevó a cabo la cocción de las mismas en un baño de agua caliente a 58°C durante 100 minutos. Tras este tratamiento se enfriaron, sumergiéndolas en un baño de agua fría, a 4°C.
- **Análisis de muestras:** se realizó una enumeración de *L. monocytogenes* sobre tres muestras, tras la inoculación y tras el tratamiento de cocción. Tras la cocción, además se



realizó la investigación en 25 g para disminuir el límite de detección de la técnica. La enumeración se realizó empleando los métodos ISO 11290-1 y 11290-2. También se determinaron el pH, la Aw y se enumeró la flora aerobia mesófila en el producto de partida y después del tratamiento de cocción.

- **Cálculo de la reducción de la población microbiana:** se calculó la diferencia entre la media de los recuentos de *L. monocytogenes* antes y después del tratamiento, evaluando si es superior a 6 log UFC/g. Se obtuvo un recuento de $6,69 \pm 0,15$ log UFC/g antes del tratamiento y $< 0,1$ log UFC/g después del tratamiento.

Respuestas al listado de verificación.

No existe un apartado específico de características del alimento en los listados de verificación.

Respuesta al árbol de decisiones.

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

SÍ, por lo tanto el ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado.



En circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a los criterios de *L. monocytogenes*. La seguridad del alimento se gestiona con la vigilancia del proceso de producción mediante PCH y procedimientos basados en APPCC.

Conclusión.

El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *Listeria monocytogenes* o su crecimiento limitado. El resultado de la verificación es **SUFICIENTE**.

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la primera parte del ejemplo

El alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.3 del Reglamento (CE) nº 2073/2005, si bien no se exigiría realizar pruebas regulares con respecto al criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:



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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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 producido
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

“(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.

(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 $pH \leq 4,4$ o a $w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5,0$ y $aw \leq 0,94$, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente*.”



EJEMPLO 5. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL – CONSIDERACIÓN DE ALIMENTO LISTO PARA EL CONSUMO - ARROZ TRES DELICIAS

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica un arroz tres delicias congelado envasado que indica en las instrucciones de uso: “Calentar 10 min en sartén a fuego vivo, y servir para comer”.

Aplicación del árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?



Resolución del ejemplo.

Surge la duda de si el producto es listo para consumir o si calentamiento que se indica se puede considerar un procesado que elimine *L. monocytogenes* en caso de estar presente en el producto.

¿Qué referencias tenemos para evaluar el tratamiento?

- “Documento de orientación Apartado 2 del anexo I” (ver también la “Guía Sanco 1628/2008: 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”) indica que:

Tratamiento térmico durante la elaboración	Se requiere una combinación de temperatura/tiempo de 70° C durante 2 minutos para una reducción D-6 (es decir, 106 o de 6 decimales) del número de células de <i>Listeria monocytogenes</i> . Otras combinaciones tiempo/temperatura también podrían lograr la misma reducción.
--	---

- “National Advisory committee on Microbiological criteria for foods (NACMCF). Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization (2004)”: Describe como verificar la eficacia de nuevas tecnologías de conservación (Microondas, HPP...) y en su “Parameters for determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols (2009)”: Indica el número de reducciones logarítmicas del microorganismo patógeno diana que debe conseguir un tratamiento (usualmente entre 5-7 log).
- “European chilled food federation (ECFF): Recommendations for the production of prepackaged chilled Food (2006)”. Indica 6 reducciones log de *L. monocytogenes*



asumiendo 2 min a 70°C e indica tabla de tiempo y temperaturas equivalentes, teniendo en cuenta una Tª de referencia de 70°C y un valor $z = 7,5^{\circ}\text{C}$.

- “Campden BRI “BRC Global Standard for Food Safety, Issue 8 Clause 5.2.5. “Cooking (heating) instructions validation (2019)”, indica 6 reducciones logarítmicas de *L. monocytogenes*, para lo que se requiere una combinación de tiempo/temperatura de 2 min a 70°C e incluye una tabla de tiempos y temperaturas equivalentes, teniendo en cuenta una temperatura de referencia de 70°C y un valor $z = 7,5^{\circ}\text{C}$. También describe premisas a la hora de validar un tratamiento en hornos, microondas, cazuelas, etc., y las peculiaridades técnicas de cada tipo.

¿Cómo evaluamos si el tratamiento cumple las citadas referencias?

Para decidir si es o no listo para el consumo, se lleva a cabo un Estudio de penetración de calor.

Se realiza la medición de la temperatura alcanzada en el producto durante el proceso de calentamiento. El producto se calienta siguiendo la instrucción de uso.

Los resultados obtenidos fueron:

- Calentamiento en sartén: el punto frío del producto supera los 2 min a temperatura $>70^{\circ}\text{C}$, por lo que destruiría a *L. monocytogenes* en caso que estuviese presente.

Respuestas al listado de verificación.

No existe un apartado específico de clasificación del alimento como listo para el consumo en los listados de verificación.

Respuesta al árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

Se puede considerar Alimento NO Listo para el Consumo

El alimento no es un ALC por lo que no se le aplican los criterios de *L. monocytogenes*.

La seguridad del alimento se gestiona mediante PCH y procedimientos basados en APPCC.

Conclusión.

Por lo tanto, no aplicaría el criterio de *L. monocytogenes* del Reglamento CE N° 2073/2005.



EJEMPLO 6. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL – CONSIDERACIÓN DE ALIMENTO LISTO PARA EL CONSUMO – LASAÑA

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica una lasaña con relleno de carne refrigerada envasada en un material plástico microondable que indica en las instrucciones de uso: “Calentar 4 min a microondas máxima potencia y servir para comer”.

Aplicación del árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?



Resolución del ejemplo.

Surge la duda de si el producto es listo para consumir o si calentamiento que se indica se puede considerar un procesado que elimine *L. monocytogenes* en caso de estar presente en el producto.

¿Qué referencias tenemos para evaluar el tratamiento?

- “Documento de orientación Apartado 2 del anexo I” (ver también la “Guía Sanco 1628/2008: GUIDANCE DOCUMENT on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) Nº 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs”) indica que:

Tratamiento térmico durante la elaboración	Se requiere una combinación de temperatura/tiempo de 70° C durante 2 minutos para una reducción D-6 (es decir, 106 o de 6 decimales) del número de células de <i>Listeria monocytogenes</i> . Otras combinaciones tiempo/temperatura también podrían lograr la misma reducción.
--	---

- “National Advisory committee on Microbiological criteria for foods (NACMCF). Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization (2004)”: Describe como verificar la eficacia de nuevas tecnologías de conservación (Microondas, HPP...) y en su “Parameters for determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols (2009)”: Indica el número de reducciones logarítmicas del microorganismo patógeno diana que debe conseguir un tratamiento (usualmente entre 5-7 log).
- “European chilled food federation (ECFF): Recommendations for the production of prepackaged chilled Food (2006)”. Indica 6 reducciones log de *L. monocytogenes* asumiendo 2 min a 70°C e indica tabla de tiempo y temperaturas equivalentes, teniendo en cuenta una Tª de referencia de 70°C y un valor z = 7,5°C.



- “Campden BRI “BRC Global Standard for Food Safety, Issue 8 Clause 5.2.5. “Cooking (heating) instructions validation (2019)”, indica 6 reducciones logarítmicas de *L. monocytogenes*, para lo que se requiere una combinación de tiempo/temperatura de 2 min a 70°C e incluye una tabla de tiempos y temperaturas equivalentes, teniendo en cuenta una temperatura de referencia de 70°C y un valor $z = 7.5^{\circ}\text{C}$. También describe premisas a la hora de validar un tratamiento en hornos, microondas, cazuelas, etc., y las peculiaridades técnicas de cada tipo.

¿Cómo evaluamos si el tratamiento cumple las citadas referencias?

Para decidir si es o no listo para el consumo, se lleva a cabo un Estudio de penetración de calor.

Se realiza la medición de la temperatura alcanzada en el producto durante el proceso de calentamiento. El producto se calienta siguiendo las instrucciones de uso.

Los resultados obtenidos fueron:

Calentamiento en microondas: el punto frío del producto no llega a 70º durante 2 minutos

Respuestas al listado de verificación.

No existe un apartado específico de clasificación del alimento como listo para el consumo en los listados de verificación.

Respuesta al árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SI, por lo tanto se puede clasificar como Alimento Listo para el Consumo

Sin perjuicio de las posibles medidas a tomar con los productos comercializados, el alimento debe cumplir con el límite de ausencia en 25 g antes de que haya salido del productor. La evaluación de la vida útil es insuficiente y el productor no puede demostrar que no se superarán los 100 ufc/g al final de la misma. Si no se sabe si los productos son seguros, no se deberían comercializar. El productor debe asegurar que no hay contaminación por *L. monocytogenes* a partir de las materias primas o el ambiente de producción. Revisión y mejora del proceso de producción, de acuerdo con los principios APPCC.



Conclusión.

Se puede clasificar como Alimento Listo para el Consumo

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005

El alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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 producido
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

“(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.

(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*.”



EJEMPLO 7. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL: BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA – QUESO FETA

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica queso feta a partir de leche de oveja pasteurizada y que se comercializa cortado y envasado en bolsas de plástico y que tiene las características que se indican en la tabla.

Vida útil declarada	4 meses
Temperatura de conservación	< 7°C
pH	4,4-4,6
a_w	0,94-0,95
[Ácido láctico]	≈1.5%

Aplicación del árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SÍ, por lo tanto se puede clasificar como **Alimento Listo para el Consumo**

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

NO

3. ¿El producto está destinado a lactantes o a usos médicos especiales?

NO

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

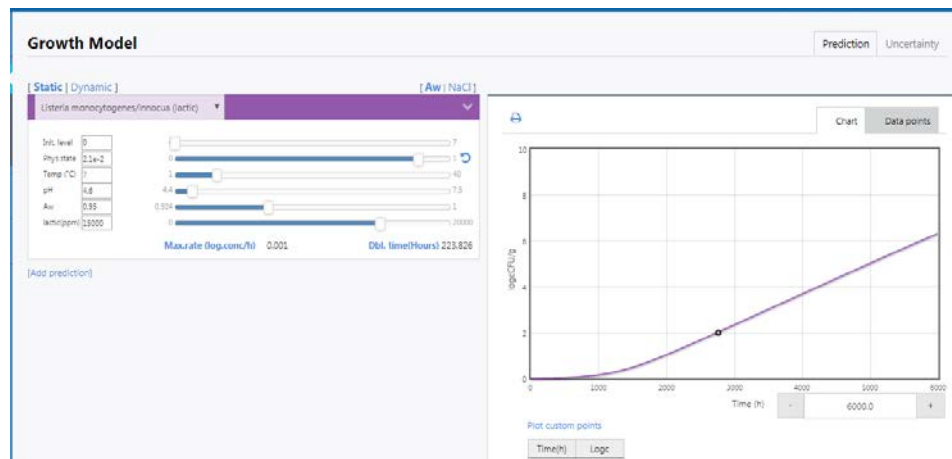
- Productos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

¿?

Resolución del ejemplo.

La empresa indica que a pesar de que de acuerdo a los modelos matemáticos integrados en COMBASE que indican que el crecimiento de *L. monocytogenes* sería posible en base al pH, la a_w y la concentración de ácido láctico de este producto (ver figura siguiente), existe bibliografía consolidada que demuestra no sólo que no es posible el crecimiento de *L. monocytogenes* sino que lo que se produce es una inactivación progresiva de los microorganismos de esta especie (ver bibliografía indicada).



Así, se adjuntan las siguientes referencias:

Bishop, J.R. and Smukowski, M. 2006. Storage Temperatures Necessary to Maintain Cheese Safety. Food Protection Trends, 26 (10): 714-724,

Gengeorgis, C., M. Carniciu, D. Dutulescu, and T. B. Farver. 1991. Growth and survival of *L. monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30°C. J. Food Prot. 54 (9):662–668.

Hunt, K.; Blanc, M.; Álvarez-Ordóñez, A.; Jordan, K. Challenge Studies to Determine the Ability of Foods to Support the Growth of *Listeria monocytogenes*. Pathogens 2018, 7, 80.

Papageorgiou, D. K., and E. H. Marth. 1989. Fate of *L. monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. J. Food Prot. 52(2):82–87.

El análisis de las mismas indica lo siguiente:

-Todas proceden de fuentes fiables. Se consideran fuentes fiables ya que se trata de artículos publicados en revistas con índice de impacto, recogidas en el Journal of Citation Reports (<https://www.recursoscientificos.fecyt.es/servicios/indices-de-impacto>). Además, se trata de estudios originales de investigación (no son revisiones, ni libros).

-El queso Feta es un alimento muy común, del que se han realizado numerosos trabajos de investigación, y se ha presentado resultados de al menos tres estudios diferentes (en caso de tratarse de un alimento muy específico, podría ser suficiente incluso con un solo trabajo de investigación, si bien complementado con estudios de microbiología predictiva).

-Todas coinciden en indicar que *L. monocytogenes* no sería capaz de crecer en el queso Feta y que, por el contrario, se produciría una inactivación gradual del mismo.

-En algunas se indica expresamente que es evidente que para este producto los parámetros físico-químicos básicos (pH, a_w , concentración de ácido) no son suficientes para determinar si *L. monocytogenes* es capaz de crecer o no ya que hay factores adicionales que, de hecho, conducen a su inactivación.

-Los estudios utilizan diferentes cepas y temperaturas de abuso lo que garantiza la validez/aplicabilidad de los resultados para los fines de este estudio.



Por lo tanto se puede concluir que ***L. monocytogenes* no podría crecer en el queso feta** y que la vida útil del producto sería válida (estaría determinada por otras características del alimento, como la presencia de las bacterias ácido-lácticas del cultivo iniciador y la proliferación de levaduras alterantes).

Respuestas al listado de verificación.

No existe un apartado específico de bibliografía científica en los listados de verificación.

Respuesta al árbol de decisiones.

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

SÍ, por lo tanto se puede concluir que *L. monocytogenes* NO puede crecer en este alimento.



Límite de 100 ufc/g en productos comercializados durante vida útil.
De acuerdo con los procedimientos basados en APPCC, la vigilancia debería centrarse en los PCC fijados (p.ej. factores intrínsecos del producto, nivel de contaminación de ingredientes, condiciones de procesado específicas).
Verificación

Conclusión.

Así pues, se concluye que la empresa ha proporcionado evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria de *Listeria monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil, y el resultado de la verificación es **SUFICIENTE**.

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005

El alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.3 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil



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 producido
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

“(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.

(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 $pH \leq 4,4$ o a $w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5,0$ y $aw \leq 0,94$, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente*.”



EJEMPLO 8. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL: ENSAYO DE DESAFÍO PARA DETERMINACIÓN DE POTENCIAL DE CRECIMIENTO – ENSALADA DE COL

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica ensalada de col lista para el consumo con las características de pH y actividad del agua que se indican en la tabla.

Ensalada de col	
pH (valor medio)	5,49
Aw (valor medio)	0,99

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SÍ, por lo tanto se puede clasificar como Alimento Listo para el Consumo

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

NO

3. ¿El producto está destinado a lactantes o a usos médicos especiales?

NO

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

NO

La ensalada de col presenta un pH medio de 5,49 y una actividad del agua media de 0,99, por lo que no hay evidencias de que *L. monocytogenes* no pueda crecer en el producto, teniendo en cuenta sus características físico-químicas.

5. ¿Se ha realizado una microbiología predictiva (modelos) adecuada?

NO, la empresa no presenta datos al respecto

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

NO, la empresa no presenta datos al respecto

7. ¿Se ha realizado un ensayo de desafío según se describe en la Guía?

¿?



Resolución del ejemplo.

La empresa presenta los resultados de un ensayo de desafío llevado a cabo en un laboratorio de análisis de alimentos. El ensayo de desafío presenta las siguientes características:

- **Número de lotes:** se analizaron tres lotes distintos de ensalada de col.
*De acuerdo a la guía técnica, en casos en que utilizando herramientas de microbiología predictiva se demuestre (i) que la probabilidad de que *L. monocytogenes* crezca en el producto es baja (<10%) y (ii) que hay una baja variabilidad en características físico-químicas (pH y Aw) entre lotes, se podría analizar un único lote de producción. Alternativamente, es necesario analizar al menos tres lotes de producción, como se ha realizado en este caso.*
- **Cepas de *L. monocytogenes*:** se utilizó un cóctel de tres cepas distintas de *L. monocytogenes* (una de ellas provenía de la colección del laboratorio europeo de referencia para *L. monocytogenes*; las otras dos eran cepas propias del laboratorio donde se ejecutó en ensayo de desafío y provenían de una muestra de queso y de una muestra ambiental de una industria alimentaria, respectivamente).
*De acuerdo a la guía técnica, es necesario utilizar un cóctel con al menos dos cepas distintas de *L. monocytogenes*. Una de ellas tiene que ser una cepa con características de crecimiento bien conocidas (el laboratorio europeo de referencia para *L. monocytogenes* ha establecido una colección al respecto). La(s) otra(s) se puede(n) elegir libremente. En este caso se cumplen estos requisitos mínimos, en cuanto a la elección y número de cepas de *L. monocytogenes*.*
- **Preparación del inóculo:** cada cepa de *L. monocytogenes* fue, en primer lugar, crecida en caldo BHI a 37°C durante 24 horas y, posteriormente, ese cultivo bacteriano fue utilizado para preparar un segundo cultivo en caldo BHI, que fue incubado a 10°C durante 5 días. Posteriormente, los cultivos de las tres cepas de *L. monocytogenes* fueron mezclados en cantidades iguales, para obtener el cóctel a utilizar para la inoculación de los lotes de ensalada de col.
De acuerdo a la guía técnica, es necesario realizar dos cultivos sucesivos de cada cepa, el primero en un medio de laboratorio no selectivo, como caldo TSB o caldo BHI, a 37°C durante el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (16 – 24 horas), y el segundo en un medio de laboratorio no selectivo a una temperatura cercana a la temperatura habitual de almacenamiento del producto (en productos listos para el consumo, habitualmente almacenados a refrigeración, deben utilizarse temperaturas bajas, como por ejemplo 7°C o 10°C) durante el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente se deben mezclar en cantidades iguales los cultivos bacterianos de cada una de las cepas que conforman el cóctel. En este caso se cumplen estos requisitos mínimos, en cuanto a la preparación del inóculo.
- **Inoculación de la muestra:** Se realizaron varias diluciones del cóctel de cepas de *L. monocytogenes* en diluyente de recuperación máxima. Posteriormente, se realizó una inoculación en profundidad. El volumen de inóculo empleado fue un 1% (p/v) de la masa de las muestras de ensalada de col. Posteriormente, se procedió a mezclar intensamente las muestras con el inóculo y se envasaron a vacío. El nivel final de contaminación fue de $2,49 \pm 0,11$ log UFC/g.
De acuerdo a la guía técnica, se pueden utilizar distintos métodos de inoculación, dependiendo del tipo de alimento. O bien el alimento se retira de su envase, se inocula y se vuelve a envasar



en condiciones similares, o bien el alimento se mantiene en su envase y se inocula por medio de un septo para mantener las condiciones atmosféricas del envase. En el primer caso, la inoculación puede realizarse en profundidad, en alimentos considerados homogéneos (por ejemplo, alimentos molidos) o preparados mezclando varios materiales (por ejemplo, ensaladas mixtas), o en superficie, para simular la contaminación de una parte específica durante el procesado (por ejemplo, productos contaminados durante el loncheado o envasado). En cualquier caso, el volumen de inoculación nunca debe superar el 1% (p/v) de la masa de producto, para no alterar significativamente las características físico-químicas del mismo, y el nivel de inoculación debe ser aproximadamente 100 UFC/g (es decir, aproximadamente 2 log UFC/g). En este caso se cumplen estos requisitos mínimos, en cuanto a la inoculación de las muestras.

- **Almacenamiento de muestras:** las muestras fueron almacenadas a 7°C durante 14 días, seguidos de 7 días a 12°C (la vida útil declarada del producto es 21 días).

De acuerdo a la guía técnica, la duración del ensayo de desafío debe ser la misma que la vida útil declarada del producto. Por otro lado, a la hora de seleccionar la temperatura de almacenamiento, se pueden utilizar registros de temperatura de la propia empresa y datos nacionales de temperatura media a nivel de venta y nivel doméstico. Si esta información no está disponible, se utilizará por defecto el siguiente perfil de tiempo y temperatura de almacenamiento: 7°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento en la empresa productora), 7°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento en el punto de venta) y 12°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento a nivel doméstico). En este caso, no se disponía de registros de temperatura en la empresa y datos del país, tanto a nivel de venta como a nivel doméstico y, por tanto, se utilizaron las condiciones por defecto. Por tanto, se cumplen los requisitos mínimos de la guía técnica, en cuanto al almacenamiento de las muestras.

- **Análisis de muestras:** se realizó una enumeración de *L. monocytogenes* al inicio del ensayo de desafío, al final de la vida útil declarada y en un punto intermedio del ensayo. El laboratorio estaba acreditado para la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos empleando el método EN ISO 17025. También se determinaron en esos tres puntos de muestreo el pH, la Aw y se enumeró la flora aerobia mesófila.

*De acuerdo a la guía técnica, el análisis microbiológico y de características físico-químicas (al menos pH y Aw) del producto debe realizarse al menos al inicio del ensayo de desafío y al final del mismo (vida útil declarada), aunque es aconsejable realizar análisis intermedios. El laboratorio de análisis preferentemente debe estar acreditado para la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos. Es aconsejable analizar también la microbiota asociada al producto (por ejemplo, mediante la enumeración de la flora aerobia mesófila o de bacterias ácido-lácticas). En este caso se cumplen estos requisitos mínimos, en cuanto al análisis microbiológico y físico-químico de las muestras.*



- **Cálculo del potencial de crecimiento:** el potencial de crecimiento, o la diferencia entre la mediana de los recuentos de *L. monocytogenes* al final del ensayo de desafío y la mediana de los recuentos de *L. monocytogenes* al comienzo del mismo, no se pudo calcular, ya que al final de la vida útil los recuentos de *L. monocytogenes* se encontraban por debajo del límite de detección (< 1 log UFC/g). En el punto de análisis intermedio (transcurridos 7 días de almacenamiento), el potencial de crecimiento en el peor escenario posible fue de -1,20 log UFC/g (potencial de crecimiento negativo).

De acuerdo a la guía técnica, si el potencial de crecimiento, calculado como la diferencia entre la mediana de los recuentos de L. monocytogenes al final del ensayo de desafío y la mediana de los recuentos de L. monocytogenes al comienzo del mismo, es superior a 0,5 log UFC/g se considera que L. monocytogenes es capaz de crecer en el producto. En el caso de la ensalada de col, el potencial de crecimiento fue negativo, llegando a obtenerse recuentos por debajo del límite de enumeración al final del ensayo de desafío.

Respuestas al listado de verificación.

En relación al listado de verificación estaríamos en la siguiente situación:

C. ENSAYOS DE DESAFIO (**).		SÍ	NO
Se han realizado ensayos de desafío para valorar la capacidad de un microorganismo para crecer en el alimento (potencial de crecimiento δ)		X	
En los ensayos de desafío para valorar el potencial de crecimiento, se han contemplado las condiciones razonablemente previsibles de:	transporte	X	
	distribución	X	
	almacenamiento, y	X	
	consumo	X	
Se han realizado ensayos de desafío para estimar los parámetros de crecimiento de un microorganismo (tasa de crecimiento máximo μ_{max}) (*)			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	
Se describe (*):	la elección de la/s cepa/s inoculadas;	X	
	el precultivo;	X	
	la concentración inicial, y	X	
	la distribución del inóculo	X	
El laboratorio que ha realizado los análisis cumple los requisitos mínimos exigibles a este tipo de laboratorios		X	



C. ENSAYOS DE DESAFIO (**).		SÍ	NO
Para responder se puede consultar el documento guía para evaluar la competencia de los laboratorios que realizan estudios de vida útil en relación con <i>L. monocytogenes</i> (EUR Lm Guidance document, 2018).			
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	
Observaciones:	*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		

** Para responder a las cuestiones planteadas en este bloque se puede consultar el apartado 4.2.2 del anexo I del presente Documento y la guía técnica del EURL *Lm* de 2014

Respuesta al árbol de decisiones.

7. ¿Se ha realizado un ensayo de desafío según se describe en la Guía?

→ SI

→ No hay potencial de crecimiento o es limitado.



Límite de 100 UFC/g para los productos comercializados durante su vida útil. Verificación de acuerdo con PCH y principios APPCC

Conclusión

Se considera que la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el alimento cumple el criterio de seguridad para *L. monocytogenes* durante toda su vida útil. La valoración del estudio se considera por tanto **SUFICIENTE** y establece un límite de 100 ufc/g para el alimento comercializado durante su vida útil.

Dado que el ensayo de desafío ha puesto de manifiesto que este alimento listo para el consumo no favorece el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, el alimento se clasifica dentro de la categoría 1.3, teniendo en cuenta que el resultado del ensayo de desafío y, por tanto, el cambio de categoría, solamente aplican a ese alimento en concreto. Cualquier cambio en la receta del producto, su procesado, etc., invalidaría los resultados del estudio de vida útil y precisaría realizarlo de nuevo.



Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la primera parte del ejemplo

El alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.3 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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 producido
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

“(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.

(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*.”



EJEMPLO 9. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL: DURABILIDAD – ENSALADA TIPO TABOULÉ

Este ejemplo se plantea en dos partes.

Planteamiento de la primera parte del ejemplo.

La empresa X fabrica una ensalada tipo taboulé, lista para el consumo, con las características que se indican en la tabla.

Vida útil declarada	12 días
Temperatura de conservación	≤ 7 °C
pH (valor medio)	5,7
a_w (valor medio)	0,99

Aplicación del árbol de decisiones a la primera parte del ejemplo.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SÍ, por lo tanto se puede clasificar como **Alimento Listo para el Consumo**

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

NO

3. ¿El producto está destinado a lactantes o a usos médicos especiales?

NO

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$
- Productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

NO, por lo tanto se puede concluir que *L. monocytogenes* puede crecer en este alimento.

5. ¿Se ha realizado una microbiología predictiva (modelos) adecuada?

NO

6. ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad según se describe en la guía?

¿?



Resolución de la primera parte del ejemplo.

Como la empresa encuentra que su alimento presenta habitualmente recuentos de *L. monocytogenes* inferiores a 100 UFC/g en las muestras obtenidas al final de la vida útil, realiza un estudio de durabilidad en un laboratorio de análisis de alimentos. El estudio de durabilidad presenta las siguientes características:

- **Selección de las muestras:** Se realiza el estudio de durabilidad con 15 muestras. Para que los datos sean representativos, se sigue un muestreo aleatorio simple de distintos lotes del mismo producto.

De acuerdo a la guía técnica, el método de muestreo debe tener en cuenta la heterogeneidad en la producción. Si no se dispone de información sobre la estructura del lote, la manera más objetiva de seleccionar las muestras es garantizando que todas tienen las mismas probabilidades de ser elegidas. Una manera de conseguirlo es mediante el muestreo aleatorio simple, que es el que se ha seguido en este caso.

- **Almacenamiento de muestras:** las muestras fueron almacenadas a 7°C durante 8 días, seguidos de 4 días a 12°C (la vida útil declarada del producto es 12 días).

De acuerdo a la guía técnica, la duración del estudio de durabilidad debe ser la misma que la vida útil declarada del producto. Por otro lado, a la hora de seleccionar la temperatura de almacenamiento, se pueden utilizar registros de temperatura de la propia empresa y datos nacionales de temperatura media a nivel de venta y nivel doméstico. Si esta información no está disponible, se utilizará por defecto el siguiente perfil de tiempo y temperatura de almacenamiento: 7°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento en la empresa productora), 7°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento en el punto de venta) y 12°C durante un tercio de la vida útil (representa el almacenamiento a nivel doméstico). En este caso, no se disponía de registros de temperatura en la empresa y datos del país, tanto a nivel de venta como a nivel doméstico y, por tanto, se utilizaron las condiciones por defecto. Por tanto, se cumplen los requisitos mínimos de la guía técnica, en cuanto al almacenamiento de las muestras.

- **Análisis de muestras:** se realizó una enumeración de *L. monocytogenes* al final de la vida útil declarada. El laboratorio estaba acreditado para la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos. Se empleó el método EN ISO 11290-2 como método de enumeración de *L. monocytogenes*, con un límite de detección de 10 ufc/g.

*De acuerdo a la guía técnica, el análisis microbiológico debe realizarse al final del estudio de durabilidad (vida útil declarada). El método de enumeración de *L. monocytogenes* es el EN ISO 11290-2, si bien se pueden emplear otros métodos validados de acuerdo a protocolos aceptados internacionalmente. En este caso se cumplen estos requisitos, en cuanto al análisis microbiológico de las muestras.*

- **Cálculos:** en la siguiente tabla se muestran los recuentos de *Listeria monocytogenes* obtenidos en el estudio de durabilidad realizado sobre 15 unidades de ensalada tipo taboulé lista para el consumo, al final de su vida útil.



Nº de muestra	Recuento (ufc/g)
1	< 10
2	25
3	< 10
4	22
5	19
6	< 10
7	16
8	33
9	26
10	10
11	< 10
12	30
13	12
14	39
15	28

A partir de estos resultados, se calcula la proporción de muestras que supera el límite de 100 ufc/g al final de su vida útil, así como los intervalos de confianza para el 95% de esa proporción.

Estudio de durabilidad 2	
Nº de muestras analizadas	15
Nº de muestras con > 100 ufc/g de <i>L. monocytogenes</i>	0
Proporción muestras con > 100 ufc/g de <i>L. monocytogenes</i>	0%
Intervalos de confianza al 95%*	0% - 17,1%

* obtenido a partir de la calculadora desarrollada por la red BIOQURA disponible en internet (<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>)

En este caso se considera que 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 de confianza llega al 17,1%, que se considera demasiado elevado.

Respuestas al listado de verificación en la primera parte del ejemplo.

En este caso, en relación al listado de verificación estaríamos en la siguiente situación:



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:	las condiciones de tiempo y temperatura "razonablemente previsibles"	x	
	las condiciones de transporte	x	
	las condiciones de distribución, y	x	
	empleo por el consumidor final	x	
El laboratorio que ha realizado los análisis cumple los requisitos mínimos exigibles a este tipo de laboratorios Para responder se puede consultar el documento guía para evaluar la competencia de los laboratorios que realizan estudios de vida útil en relación con <i>L. monocytogenes</i> (EUR Lm Guidance document, 2018).		x	
Se analizan usando los métodos de referencia o alternativos		x	
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*
Observaciones:	* El intervalo de confianza es demasiado elevado		

** Para responder a las cuestiones planteadas en este bloque se puede consultar el apartado 4.2.1 del anexo I del presente Documento y la guía técnica del EURL Lm de 2014



Respuesta al árbol de decisiones en la primera parte del ejemplo.

6. ¿Hay un histórico de datos apropiado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el alimento y/o se han realizado pruebas de durabilidad según se describe en la guía?

→ **SÍ** →

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



El proceso de producción o la valoración de la vida útil no están bajo control. El productor debe asegurar que no hay contaminación por *L. monocytogenes* a partir de las materias primas o del ambiente de producción. Si no se sabe si los productos son seguros, no deberían comercializarse. Revisión y mejora del proceso de producción, de acuerdo con los principios APPCC y revisión de la vida útil.

Conclusión de la primera parte del ejemplo.

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

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005 en la primera parte del ejemplo

En este caso, el alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005, y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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		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 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
--	-------------------------------	---	---	-----------	----------------	--

“(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.

(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 $pH \leq 4,4$ 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*.”

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

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

Planteamiento y resolución de la segunda parte del ejemplo.

La empresa amplía el estudio de durabilidad hasta 200 muestras.

- **Selección, almacenamiento y análisis de las muestras:** El estudio se amplía hasta 200 muestras, tomadas también tras un muestreo aleatorio simple y siguiendo los mismos protocolos de almacenamiento y análisis de las muestras.
- **Cálculos:** en la siguiente tabla se muestran los recuentos de *Listeria monocytogenes* obtenidos en el estudio de durabilidad realizado sobre las 200 unidades de ensalada tipo taboulé lista para el consumo, al final de su vida útil.



Nº de muestra	Recuento (ufc/g)	Nº de muestra	Recuento (ufc/g)	Nº de muestra	Recuento (ufc/g)	Nº de muestra	Recuento (ufc/g)
1	< 10	51	< 10	101	10	151	24
2	25	52	37	102	37	152	38
3	< 10	53	12	103	< 10	153	34
4	22	54	33	104	15	154	< 10
5	19	55	36	105	< 10	155	10
6	< 10	56	31	106	< 10	156	25
7	16	57	12	107	< 10	157	< 10
8	33	58	16	108	< 10	158	< 10
9	26	59	14	109	13	159	23
10	10	60	33	110	< 10	160	< 10
11	< 10	61	16	111	< 10	161	34
12	30	62	24	112	22	162	33
13	12	63	29	113	28	163	10
14	39	64	28	114	23	164	15
15	28	65	35	115	18	165	18
16	16	66	18	116	37	166	14
17	29	67	22	117	< 10	167	11
18	12	68	29	118	18	168	39
19	31	69	18	119	< 10	169	36
20	19	70	37	120	24	170	13
21	30	71	13	121	28	171	25
22	30	72	< 10	122	< 10	172	11
23	17	73	28	123	31	173	20
24	9	74	10	124	31	174	18
25	28	75	11	125	26	175	35
26	6	76	38	126	< 10	176	< 10
27	20	77	< 10	127	26	177	33
28	18	78	39	128	33	178	< 10
29	32	79	28	129	34	179	35
30	40	80	32	130	< 10	180	40
31	39	81	30	131	31	181	10
32	25	82	< 10	132	28	182	39
33	23	83	35	133	21	183	37
34	15	84	19	134	23	184	10
35	17	85	10	135	< 10	185	31
36	33	86	25	136	11	186	< 10
37	27	87	13	137	32	187	22
38	37	88	< 10	138	< 10	188	< 10
39	30	89	26	139	< 10	189	< 10
40	20	90	< 10	140	< 10	190	10
41	23	91	29	141	34	191	20
42	2	92	19	142	< 10	192	18
43	34	93	39	143	< 10	193	32
44	34	94	37	144	24	194	< 10
45	32	95	28	145	28	195	< 10
46	4	96	< 10	146	37	196	35
47	32	97	21	147	22	197	24
48	37	98	35	148	17	198	22
49	18	99	11	149	16	199	27
50	32	100	< 10	150	38	200	18



A partir de estos resultados, se calcula la proporción de muestras que supera el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil, así como los intervalos de confianza para el 95% de esa proporción.

Estudio de durabilidad 1	
Nº de muestras analizadas	200
Nº de muestras con > 100 ufc/g de <i>L. monocytogenes</i>	0
Proporción muestras con > 100 ufc/g de <i>L. monocytogenes</i>	0%
Intervalos de confianza al 95%*	0% - 1,5%

* obtenido a partir de la calculadora desarrollada por la red BIOQURA disponible en internet (<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>)

Si bien no hay un límite definido legalmente o recomendado para los intervalos de confianza, el límite superior de dicho intervalo es muy pequeño, por lo que el estudio de durabilidad se puede considerar como **VÁLIDO**.

Respuestas al listado de verificación en la segunda parte del ejemplo.

En relación al listado de verificación estaríamos en la siguiente situación:

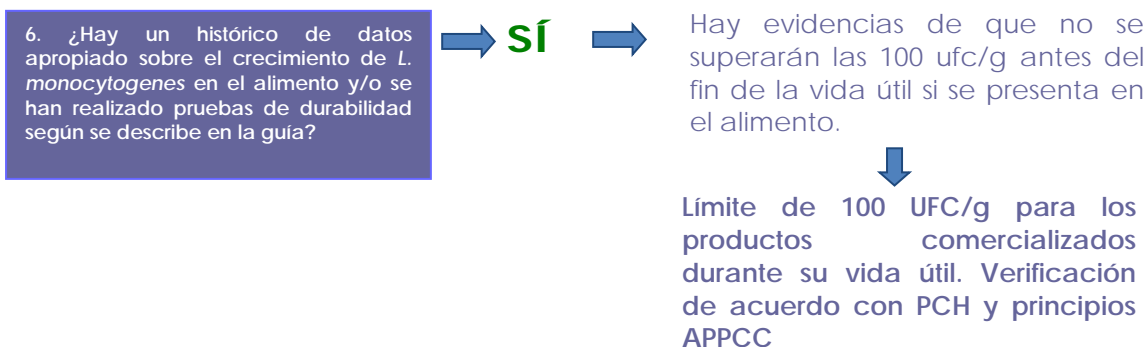
B. ESTUDIOS DE DURABILIDAD (**).		SÍ	NO
Se realiza un muestreo aleatorio simple (*)		x	
El muestreo se repite para diferentes lotes a fin de tener en cuenta su variabilidad		x	
Se contemplan:	las condiciones de tiempo y temperatura “razonablemente previsibles”	x	
	las condiciones de transporte	x	
	las condiciones de distribución, y	x	
	empleo por el consumidor final	x	
El laboratorio que ha realizado los análisis cumple los requisitos mínimos exigibles a este tipo de laboratorios Para responder se puede consultar el documento guía para evaluar la competencia de los laboratorios que realizan estudios de vida útil en relación con <i>L. monocytogenes</i> (EUR Lm Guidance document, 2018).		x	
Se analizan usando los métodos de referencia o alternativos		x	
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		x	



B. ESTUDIOS DE DURABILIDAD (**).		SÍ	NO
durante toda su vida útil?			
Observaciones:			

** Para responder a las cuestiones planteadas en este bloque se puede consultar el apartado 4.2.1 del anexo I del presente Documento y la guía técnica del EURL Lm de 2014

Respuesta al árbol de decisiones en la segunda parte del ejemplo.



Conclusión de la segunda parte del ejemplo.

Se considera que la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el alimento cumple el criterio de seguridad para *L. monocytogenes* durante toda su vida útil. La valoración del estudio se considera por tanto **SUFICIENTE** y establece un límite de 100 ufc/g para el alimento comercializado durante su vida útil.

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la segunda parte del ejemplo

En este caso, el alimento también se clasificaría dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005, pero le aplicaría otro criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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		EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control



				(7)		inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
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

“(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.

(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 $pH \leq 4,4$ 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*.”



EJEMPLO 10. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL: MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA – SASHIMI DE SALMÓN

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X fabrica y distribuye filetes (Sashimi) de Salmón envasado en atmósfera modificada con las características que se indican en la tabla.

Vida útil declarada	6 días
Temperatura de conservación	≤ 7 °C
pH	6,1-6,2
a_w	0,99
Atmósfera envasado	50% CO ₂ /50 %N ₂

Aplicación del árbol de decisiones.

1. ¿El productor o el fabricante destina el alimento para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *L. monocytogenes* a un nivel aceptable?

SÍ, por lo tanto se puede clasificar como **Alimento Listo para el Consumo**

2. ¿El ALC pertenece a la categoría de alimentos en la cual es bastante probable la ausencia de *L. monocytogenes* o su crecimiento limitado?

NO

3. ¿El producto está destinado a lactantes o a usos médicos especiales?

NO

4. ¿Comparando las características del producto con la bibliografía científica hay evidencias de que *L. monocytogenes* no crece en el producto? Esto incluye, p.ej.:

- Productos con pH ≤ 4.4 ó a_w ≤ 0.92
- Productos con pH ≤ 5.0 y a_w ≤ 0.94
- Productos con vida útil inferior a 5 días
- Productos congelados

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

NO, por lo tanto se puede concluir que *L. monocytogenes* puede crecer en este alimento.

5. ¿Se ha realizado una microbiología predictiva (modelos) adecuada?

¿?

Resolución del ejemplo.

De acuerdo a los registros de la empresa, los 52 lotes fabricados en el último dieron (las tres muestras analizadas) ausencia en 25 gramos. Estos valores corresponden al producto recién fabricado.

En cualquier caso, las características del producto (detalladas en la tabla) y sus condiciones de conservación permitirían el crecimiento de *L. monocytogenes*, como así asume la empresa.



Por ello, la empresa presentó el siguiente estudio de microbiología predictiva para justificar la validez de la vida útil asignada. Para ello, utilizó en primer lugar el programa COMBASE utilizando los siguientes parámetros:

-Modelo: Dinámico

-Microorganismo: *L. monocytogenes/innocua*

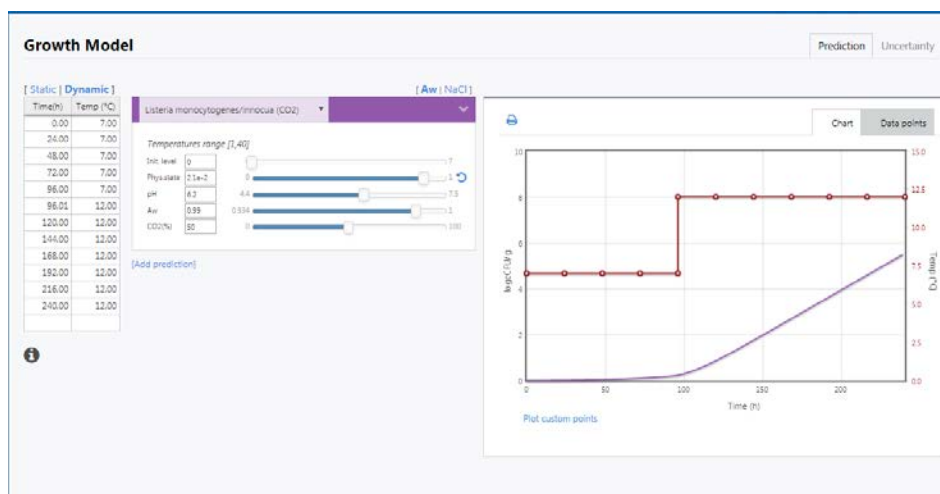
-Nº inicial: 1 UFC/g (0 Log UFC/g) -que es el mínimo que permite seleccionar el programa-

-Condiciones de crecimiento más favorables para el crecimiento microbiano: pH 6,2.

-Tª de almacenamiento: 7 °C durante 2/3 del almacenamiento (4 días) y 12 °C durante 1/3 (2 días)

-Concentración de CO2: 50 %

-Estado fisiológico de las células: El prefijado por COMBASE para este microorganismo: 2.1e-2

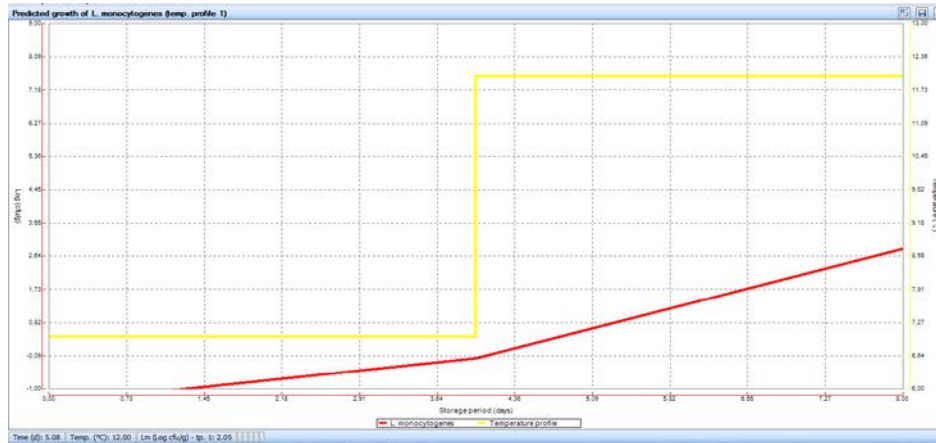


De acuerdo a los datos obtenidos con el modelo integrado en COMBASE, en estas condiciones, alcanzar las 100 UFC/g, que es el máximo permitido para este tipo de productos, y en el peor escenario posible requeriría de 150 horas, aproximadamente 6,25 días. Esto concuerda razonablemente con lo declarado por la empresa, teniendo en cuenta, además, que el estado fisiológico (α) de las células de *L. monocytogenes* sería previsiblemente “peor” (necesitarían mayor tiempo de adaptación probablemente) que el utilizado en el modelo y que el número inicial utilizado en el modelo es muy superior al determinado experimentalmente (25 veces que el peor escenario posible: 1 UFC/25 gramos).

Adicionalmente, la empresa presenta los resultados obtenidos con otro programa de microbiología predictiva, el FSSP (“Food Spoilage and Safety Predictor”, disponible bajo descarga gratuita) dado que una de las fortalezas de este segundo programa es la abundante y validada información que tiene acerca de productos de la pesca. Adicionalmente este programa es capaz de determinar la concentración de CO2 que quedará en el espacio de



cabeza en función de la concentración inicial en la bandeja (parte del CO2 difundirá al tejido del pescado). En este caso se ha utilizado una ratio de aire: producto de 2:1, un escenario conservador ya que probablemente esta sería superior lo que ralentizaría aún más el crecimiento de *L. monocytogenes*.



De acuerdo a este segundo programa el tiempo para alcanzar las 100 UFC/g sería de aproximadamente 7 días si no se considera la existencia de fase lag (peor escenario posible) y de más de 8 días si se considera la existencia de la misma; en ambos casos partiendo de una concentración inicial de 0,04 UFC/g (1 UFC en 25 gramos).

Teniendo en cuenta que estas predicciones se han hecho en el “peor escenario posible”, que los modelos están basados en datos obtenidos en diferentes estudios (ver bases de datos de COMBASE y FSSP) y que, en el caso del segundo, además han sido extensivamente validados (ver herramienta FSSP) en pescado y productos de la pesca (o sea, en la matriz objeto de estudio) la vida útil estimada se puede considerar como **VÁLIDA** dado que el estudio de vida útil está ejecutado correctamente y los resultados concuerdan con la vida útil estimada.

Respuestas al listado de verificación.

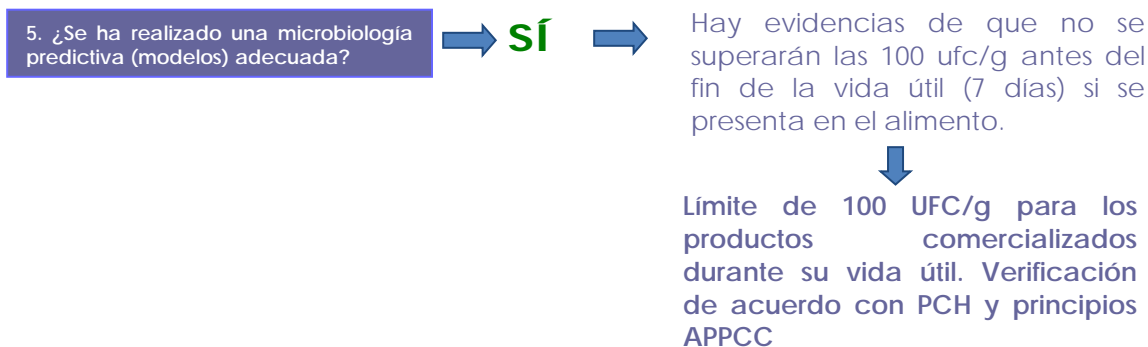
En relación al listado de verificación estaríamos en la siguiente situación:

A. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	SÍ	NO
<p>Se usa un modelo predictivo adecuado (Combase, Pathogen Modelling Programme, MicroHibro...)</p> <p>Para responder se puede consultar el listado de herramientas contrastadas disponibles para microbiología predictiva en la página web del Instituto Federal Alemán para el Análisis de Riesgos (BfR): https://foodrisklabs.bfr.bund.de/microbial-modeling-exchange-wiki/</p>	x	
<p>El modelo predictivo utilizado incluye entre sus parámetros aquellas características del alimento en estudio que influyen en el crecimiento o supervivencia del microorganismo en cuestión</p> <p>Para responder se puede consultar el apartado 1 del anexo I del presente Documento</p>	x	



<p>Se usan modelos para predecir tiempo de latencia y velocidad de crecimiento para evaluar el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en el alimento (*)</p> <p>Para responder se puede consultar el apartado 4.1 del anexo I del presente Documento y la guía SANCO 11510/2013</p>	x	
<p>Se considera la variabilidad de las características del alimento y de las condiciones de procesado y de conservación</p>	x*	
<p>¿El Estudio de Microbiología Predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple con el criterio durante toda su vida útil?</p>	x	
<p>Observaciones:</p>	<p>*Se considera el peor escenario posible.</p>	

Respuesta al árbol de decisiones.



Conclusión.

Así pues, se concluye que la empresa ha proporcionado evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria de *L. monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil, y el resultado de la verificación es **SUFICIENTE.**

Categoría de alimento en relación al Reglamento (CE) nº 2073/2005

El alimento se clasificaría dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:



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>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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 producido
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

“(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.

(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 $pH \leq 4,4$ o a $w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5,0$ y $aw \leq 0,94$, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente*.