



EURL Lm

Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la
Listeria monocytogenes
<http://eurl-listeria.anses.fr>

DOCUMENTO DE ORIENTACIÓN TÉCNICA DEL LABORATORIO DE REFERENCIA DE LA UE PARA *Lm*

**sobre ensayos de desafío y estudios de durabilidad para evaluar la vida
útil de alimentos listos para el consumo en relación con la *Listeria
monocytogenes***

Versión 4 del 1 de julio de 2021

Hélène Bergis, Ludivine Bonanno, Adrien Asséré, Bertrand Lombard, Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la *Listeria monocytogenes* Anses -Food Safety Laboratory, Maisons-Alfort, France

En colaboración con un grupo de trabajo de representantes de Laboratorios nacionales de referencia (LNR) para la *Listeria monocytogenes* y una autoridad competente (AC):

- Marie Polet, Sciensano (LNR). Bélgica;
- Jens Kirk Andersen, Instituto nacional de alimentación (LNR), Dinamarca;
- Bernadette Hickey, División de Microbiología Alimentaria, Departamento de Agricultura, Alimentación y Medio Marino (LNR), República de Irlanda;
- Francesco Pomilio, Instituto Zooprofiláctico Experimental de la región de Abruzzos y Molise (LNR), Italia;
- Paul in't Veld, Charlotte Verbart, Autoridad de Seguridad Alimentaria y de los Productos de Consumo, (NVWA), (AC y LN-LNR), Países Bajos;
- Taran Skjerdal, Instituto veterinario noruego (LNR), Noruega;
- Gail Betts, Campden BRI (R.U. LNR), Reino Unido.

ÍNDICE

Preámbulo	5
1 Introducción	6
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	6
1.2 Contexto legislativo	8
1.3 Documentos de orientación de la UE	8
2 Alcance.....	9
3 Referencias normativas	12
4 Definiciones	13
4.1 Alimentos listos para consumo (ALC)	13
4.2 Vida útil de los ALC.....	13
5 Papel de los operadores de empresas alimentarias y de los laboratorios	14
6 Ensayos de desafío (<i>Challenge test</i>).....	15
6.1 Prerrequisitos antes de iniciar un ensayo de desafío.....	15
6.2 Ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento.....	17
6.2.1 Introducción	17
6.2.2 Protocolo de un ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento.....	18
6.2.2.1 Selección de lotes	18
6.2.2.2 Selección de cepas.....	19
6.2.2.3 Preparación del inóculo	19
6.2.2.4 Inoculación de unidades de ensayo.....	19
6.2.2.5 Número de unidades: número de puntos de muestreo	21
6.2.2.6 Condiciones de almacenamiento	21
6.2.2.7 Medición de los parámetros fisicoquímicos	22
6.2.2.8 Análisis microbiológicos	24
6.2.2.9 Cálculo del potencial de crecimiento.....	25
6.2.2.10 Aplicación de resultados	27
6.2.2.11 Informe del ensayo.....	28

6.3	Ensayos de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento.....	29
6.3.1	Introducción.....	29
6.3.2	Protocolo de ensayo de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento	29
6.3.2.1	Número de lotes.....	29
6.3.2.2	Selección de cepas.....	30
6.3.2.3	Preparación del inóculo	30
6.3.2.4	Inoculación de las unidades de ensayo	30
6.3.2.5	Número de unidades: número de puntos de muestreo	31
6.3.2.6	Condiciones de almacenamiento	31
6.3.2.7	Análisis microbiológicos	31
6.3.2.8	Cálculo de la velocidad máxima de crecimiento	31
6.3.2.9	Aplicación de resultados.....	32
6.3.2.10	Informe de ensayo	35
7	Estudio de durabilidad.....	36
7.1	Introducción.....	36
7.2	Protocolo de estudio de durabilidad.....	36
7.2.1	Descripción de los ALC que se analizarán	37
7.2.2	Muestreo de alimentos	37
7.2.3	Almacenamiento de muestras	37
7.2.4	Análisis microbiológicos	37
7.2.5	Resultados.....	38
7.2.6	Informe del estudio	40
8	Referencias.....	41
9	Definiciones	43
10	Anexos.....	44
10.1	Tabla en la que se muestran los beneficios/limitaciones de los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento, la velocidad máxima de crecimiento y de los estudios de durabilidad.	44
10.2	Diagrama de flujo para establecer y verificar la vida útil de los alimentos listos para consumo con respecto de la <i>Listeria monocytogenes</i>	45
10.3	Listado de parámetros característicos del producto que repercuten en el crecimiento de la <i>Lm</i>	46

10.4	Diagrama de flujo que describe esquemáticamente los pasos desde los datos históricos de operadores de empresas alimentarias hasta las pruebas de laboratorio	47
10.5	Conjunto de cepas de <i>L. monocytogenes</i> y sus características de crecimiento	48
10.6	Ejemplo de preparación del inóculo para el ensayo de desafío	49
10.7	Ejemplos de técnicas de contaminación	51
10.8	Ejemplos del número total de unidades necesarias para ensayos de desafío que evalúan el potencial de crecimiento	53
10.9	Ejemplo de la repercusión de la temperatura de almacenamiento en la vida útil	55
10.10	Uso de la calculadora FSSP para el cálculo WPS y a_w	56
10.11	Ejemplos del uso de ácidos orgánicos como conservantes alimenticios	57
10.12	Medición de la atmósfera de gas para comprobar la estanqueidad del envase	58
10.13	Ejemplo de preparación de la suspensión inicial	58
10.14	Ejemplos del número total de unidades necesarias en los ensayos de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento	59
10.15	Muestreo aleatorio único	60

Preámbulo

El presente documento es la cuarta versión del *Documento de orientación técnica del laboratorio de referencia de la UE para Listeria monocytogenes (EURL-Lm en sus siglas en inglés) sobre ensayos de desafío y estudios de durabilidad para evaluar la vida útil de alimentos listos para el consumo en relación con la Listeria monocytogenes*. Sustituye a la tercera versión de 6 de junio de 2014, y a la modificación 1 del 21 de febrero de 2019.

La primera La primera versión de este “Documento de orientación técnica” (2008) se redactó a petición de la Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria (DG SANCO) de la Comisión Europea (CE), en respuesta a las necesidades expresadas por los Estados miembros, quienes solicitaban un documento en el que se facilitase información detallada y práctica sobre cómo llevar a cabo estudios de vida útil sobre *Listeria monocytogenes* (Lm) en alimentos listos para consumo (ALC) para garantizar el cumplimiento de los criterios microbiológicos que se establecen en el Artículo 3.2 del Reglamento (CE) N.º 2073/2005.

La presente revisión tiene por objeto garantizar la coherencia entre el “Documento de orientación técnica del EURL *Lm*” y la norma *EN ISO 20976-1 sobre «Microbiología de la cadena alimentaria. Directrices y requisitos para la realización de ensayos de desafío de productos alimenticios y piensos. Parte 1: Ensayos de desafío para estudiar el potencial de crecimiento, el tiempo de latencia y la tasa máxima de crecimiento*, publicada en 2019.

En la norma se especifican los protocolos para llevar a cabo ensayos de desafío en estudios de crecimiento de bacterias y levaduras que no formen micelo, mientras que el “Documento de orientación técnica del EURL *Lm*” abarca los aspectos técnicos específicos de la *Lm* en ALC que no cubre la norma. Por ende, el “Documento de orientación técnica del EURL *Lm*” debe ser leído ahora junto con la norma y debe considerarse como un documento complementario a la norma EN ISO 20976-1.

La revisión de este documento de orientación también incluye la experiencia obtenida a lo largo de los años en los ensayos de desafío.

El documento sigue siendo complementario al documento CE/DG SANCO titulado «Documento de orientación sobre los estudios de vida útil de *Listeria monocytogenes* para alimentos listos para consumo, según el *Reglamento (CE) n.º. 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*».

La cuarta versión del documento de orientación fue redactada por el EURL *Lm* junto con un grupo de trabajo de seis LNR en *Lm* y fue aprobada por el Comité Permanente de Plantas, Animales, Alimentos y Piensos el 1 de julio de 2021.

1 Introducción

1.1 *Listeria monocytogenes*

En la actualidad, el género *Listeria* comprende 20 especies, entre las que se incluye la *Listeria monocytogenes*, una bacteria patógena que puede causar una enfermedad llamada listeriosis que puede afectar a los humanos y a un gran número de especies animales.

A nivel microscópico, la *Lm* tiene aspecto de un pequeño bacilo Gram positivo (0,5-2 μm x 0,5 μm) que se presenta individualmente o en pequeñas cadenas, es móvil a 20-25°C y no es formadora de esporas. Es una bacteria aeróbica y anaeróbica facultativas, catalasa positiva, excepto algunas cepas menos comunes, oxidasa negativa y esculina positiva. La *Listeria* fermenta numerosos carbohidratos sin producir gas. Las cepas de *Lm* son D-xilosa negativas y producen lecitinasa. Suenen ser beta hemolíticas y L-ramnosa positivas.

La *Lm* es diversa desde el punto de vista genético: las cepas se clasifican en cuatro linajes evolutivos (I-IV), 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, y 7) en función del serotipado convencional (antígenos somáticos y flagelares) y 4 serogrupos moleculares principales (IIa., IIb, IIc y IVb) en función de pruebas PCR.

Históricamente, el serotipo 4b (serogrupo IV b) era el serotipo con mayor prevalencia en los casos clínicos en humanos y se encontraba con menor frecuencia en alimentos. Sin embargo, a lo largo de la última década, el serotipo 1/2a (serogrupo IIa) ha sido el serotipo más predominante en muestras alimentarias y ambientales y con frecuencia se ha vinculado a enfermedades en humanos, causando brotes significativos en Europa y Norteamérica.

Recientemente, en las investigaciones de brotes, se ha pasado de emplear la electroforesis de campo pulsado (PFGE), que solía considerarse el criterio de referencia para la tipificación bacteriana, a la tipificación con secuenciación completa del genoma (WGS), técnica que presenta una mayor capacidad de discriminación en comparación con la PFGE (Gillesberg Lassen et al., 2016).

Numerosos estudios de tipificación bacteriana mediante Multi Locus Sequence Typing (MLST) revelan que la población de *Lm* es, en gran medida, clonal. La mayoría de las cepas se recopilan en unos pocos e importantes Complejos clonales (CC) que se definen como grupos de aislamientos que presentan secuencias tipo (ST). En la actualidad, los CC y las ST se utilizan de manera sistemática para clasificar las poblaciones de cepas.

Los CC hipervirulentos e hipovirulentos se diferencian combinando enfoques epidemiológicos, clínicos y experimentales (Maury et al., 2016). Las cepas CC1, CC2, CC4, CC6 (linaje I) y representaron la mayoría de los brotes de listeriosis y casos esporádicos en humanos y animales. Otros CC, como CC9 o CC121 (linaje II) suelen aparecer más aislados en pacientes altamente inmunodeprimidos. Estos CC predominan en los alimentos, en todos los sectores alimentarios (Felix et al., 2018) y pueden permanecer durante varios años en diferentes entornos de producción de alimentos. No obstante, se espera que la WGS ofrezca un conocimiento más exhaustivo y detallado de este ámbito en el futuro.

La *Lm* es una bacteria ubicua y telúrica ampliamente extendida en el ambiente. Se trata de una bacteria psicotrópica capaz de crecer a temperaturas de refrigeración (Tabla 1).

Tabla 1: Características de crecimiento/supervivencia de *L. monocytogenes* (cepa-específica) en medio de cultivo

	Mín. (límite de crecimiento inferior)	Crecimiento óptimo (crecimiento más rápido)	Máx. (límite de crecimiento superior)	Supervivencia (pero sin crecimiento)
Temperatura (°C)	-2	30 - 37	45	-18
pH	4,0 - 4,3	7,0	9,6	3,3 – 4,2
a_w	0,92 (0,90 con glicerol)	0,99	/	< 0,90
Contenido NaCl			12	≥20
Atmósfera gaseosa	Anaerobios facultativos y microaerófilos (pueden crecer en presencia / ausencia de O ₂ . (por ejemplo, en vacío o en atmósferas de gases modificadas)			

Fuentes: Las características de crecimiento de la *Lm* hacen referencia a la hoja de datos de Anses sobre peligros biológicos «*Listeria monocytogenes*», 2020; las características de supervivencia de la *Lm* hacen referencia al documento CE/DG SANCO titulado «Documento de orientación sobre los estudios de vida útil de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo, según el Reglamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios».

La transmisión de *L. monocytogenes* suele producirse cuando los alimentos se cosechan, procesan, preparan, envasan, transportan o almacenan en entornos contaminados con *Lm*. La mayoría de los alimentos listos para consumo son susceptibles a la contaminación con *Lm*, pero solo aquellos en los que pueda sobrevivir o crecer la *Lm* constituyen causas potenciales de listeriosis. La transmisión alimentaria es, con diferencia, la vía de transmisión a los humanos más importante (99 % de los casos). Las personas pueden desarrollar listeriosis tras comer alimentos contaminados con *Lm*.

La listeriosis se produce tanto de formas invasivas (materno-neonatal y no materno-neonatal) como en formas no invasivas (gastroentérica) (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de listeriosis y síntomas

Tipo de listeriosis	Tiempo de incubación	Síntomas principales	Consecuencias médicas
Forma materno-neonatal	17 a 67 días media: 28 días	- Síndrome pseudogripal (fiebre...) - Absorción espontánea - Muerte intrauterina, nacimientos prematuros - Infección neonatal	20 % a 30 % Letalidad en recién nacidos
Formas no materno-neonatales	Bacteriemia: 1 a 12 días media: 2 días Forma neuromeningea: 2 a 14 días media: 9 días	- Septicemia - Meningitis, meningorombencefalitis,	Secuelas neurológicas Letalidad 20 % al 30 %
Forma gastroentérica	6 horas a 4 días media: 24 horas	- Fiebre - Náuseas, vómitos, diarrea	

Fuentes: Hoja de datos de Anses sobre peligros biológicos «*Listeria monocytogenes*», 2020.

La listeriosis invasiva es la forma más grave de la enfermedad y afecta de forma particular a algunos grupos de población de alto riesgo, tales como mujeres embarazadas y sus recién nacidos, ancianos y personas con sistemas inmunes debilitados.

1.2 Contexto legislativo

En el *Reglamento (CE) N.º 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios* se establecen las normas que deben cumplir los operadores de las empresas alimentarias y se especifican los criterios microbiológicos de determinados microorganismos.

En el Anexo I de dicho Reglamento se establecen los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria aplicables a la *Lm* en ALC (criterios 1.1 a 1.3). En especial, el criterio 1.1 se refiere a ALC destinados a lactantes y para usos médicos especiales; los otros dos criterios (1.2 y 1.3) se refieren al resto de ALC. En el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 se establece un límite cuantitativo de 100 ufc/g para el criterio 1.3 (Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *Lm*) y para el criterio 1.2 (Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *Lm*) cuando el fabricante pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que no se excederá el límite de 100 ufc/g a lo largo de toda la vida útil del producto.

En el artículo 3, del párrafo 2, del Anexo II de este Reglamento se especifica que el operador de la empresa alimentaria realizará los estudios pertinentes para evaluar el crecimiento de *Lm* que pueda estar presente en el producto durante su vida útil en condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles.

1.3 Documentos de orientación de la UE

El documento CE/DG SANCO titulado *Documento de orientación sobre los estudios de vida útil de la Lm para alimentos listos para consumo, según el Reglamento (CE) n.º. 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*, está dirigido a operadores de empresas alimentarias que produzcan alimentos listos para consumo. También pueden utilizarlo las autoridades competentes (AC) para verificar la correcta aplicación de los estudios de vida útil realizados por parte de los operadores de empresas alimentarias.

El documento tiene por objeto orientar a los operadores de empresas alimentarias que producen ALC en la identificación del riesgo de *Lm* en sus productos, y en cómo proceder para demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que estos productos no excederán el criterio cuantitativo (1.2a y 1.3 del Reglamento (CE) N.º 2073/2005) a lo largo de su vida útil. Un árbol de decisiones que recoja un enfoque sistemático de los pasos en los estudios de vida útil ofrece a los operadores de empresas alimentarias indicaciones sobre cuándo se precisan estudios específicos adicionales para investigar el crecimiento de *Lm* en el producto.

El Documento de Orientación del EURL *Listeria monocytogenes* (EURL-*Lm*) para evaluar la competencia de los laboratorios en la aplicación de ensayos de desafío y estudios de durabilidad, en relación con la *Listeria monocytogenes*, en alimentos listos para el consumo está diseñado para ser empleado por parte de las AC y de los LNR, si así lo determinan sus AC. Este documento de orientación tiene por objeto establecer un enfoque armonizado acerca del método que deben seguir los laboratorios para realizar ensayos de desafío y sobre cómo evaluar la competencia de los laboratorios para ejecutar estudios de vida útil en relación con la *Lm*. Fue elaborado por el EURL *Lm* junto con la colaboración de los representantes de los Laboratorios nacionales de referencia en *Lm* (LNR en *Lm*) y AC.

2 Alcance

- El “Documento de orientación técnica del EURL *Lm*” debe leerse junto con la norma EN ISO 20976-1 «Directrices y requisitos para la realización de ensayos de desafío de productos alimenticios y piensos. Parte 1: ensayos de desafío para estudiar el potencial de crecimiento, el tiempo de latencia y la velocidad máxima de crecimiento».

En la norma EN ISO 20976-1 se especifica el protocolo para realizar ensayos de desafío para bacterias o levaduras que no formen micelo, y en el “Documento de orientación técnica del EURL *Lm*”, como documento complementario, se incluyen especificaciones sobre la *Lm*. Contiene secciones específicas que deben tenerse en cuenta para evaluar la vida útil de los alimentos listos para consumo en relación con la *Lm*.

En este documento se ofrecen directrices sobre cómo realizar los estudios recogidos en el Anexo II del Reglamento (CE) n° 2073/2005 que pueden ser adoptados para evaluar la vida útil de los ALC con respecto de la *Lm*.

- (1) Ensayos de desafío (ensayos de desafío para determinar el potencial de crecimiento y ensayos de desafío para determinar la velocidad de crecimiento máxima);
 - (2) Estudios de durabilidad.
- El objetivo de los ensayos de desafío consiste en validar la vida útil de un producto alimentario bajo unas condiciones de almacenamiento determinadas, facilitando información sobre el comportamiento de la *Lm* (crecimiento, supervivencia o disminución) en los casos en los que se inocula de forma artificial. En los ensayos de desafío debe tenerse en cuenta la variabilidad de los lotes, de las muestras de alimentos y de las cepas. En un ensayo de desafío es complicado recrear el nivel de contaminación, la heterogeneidad de la contaminación y el estado fisiológico de la bacteria. Por ende, el método de contaminación no siempre representa por completo la contaminación natural.
 - El objetivo de los estudios de durabilidad consiste en verificar la vida útil de un producto alimentario en unas condiciones de almacenamiento determinadas. En los estudios de durabilidad se evalúa el crecimiento o la supervivencia de la *Lm* que puede estar presente de forma natural en un alimento durante su vida útil, en condiciones razonables y previsibles de distribución, almacenamiento y uso.

Aunque los estudios de durabilidad pueden considerarse más realistas que los ensayos de desafío, puesto que la contaminación se produce de manera natural, su uso para validar es limitado. Debido a la baja prevalencia de *Lm*, el bajo nivel de contaminación de *Lm* y su distribución heterogénea en el alimento, no se recomienda realizar estudios de durabilidad para validar la vida útil de un producto en relación con la *Lm*. Su uso resulta más adecuado para verificar la vida útil.

- La elección de los estudios que se llevarán a cabo debe ser realizada por el operador de la empresa alimentaria, si es necesario con la colaboración del laboratorio competente, que es el que los realizará. La elección debe basarse en la información que debe obtenerse, como se muestra en la Imagen 1.

En la Imagen 1 se presentan los tipos de estudios posibles para determinar el crecimiento de *Lm* en ALC y los resultados obtenidos en cada caso.

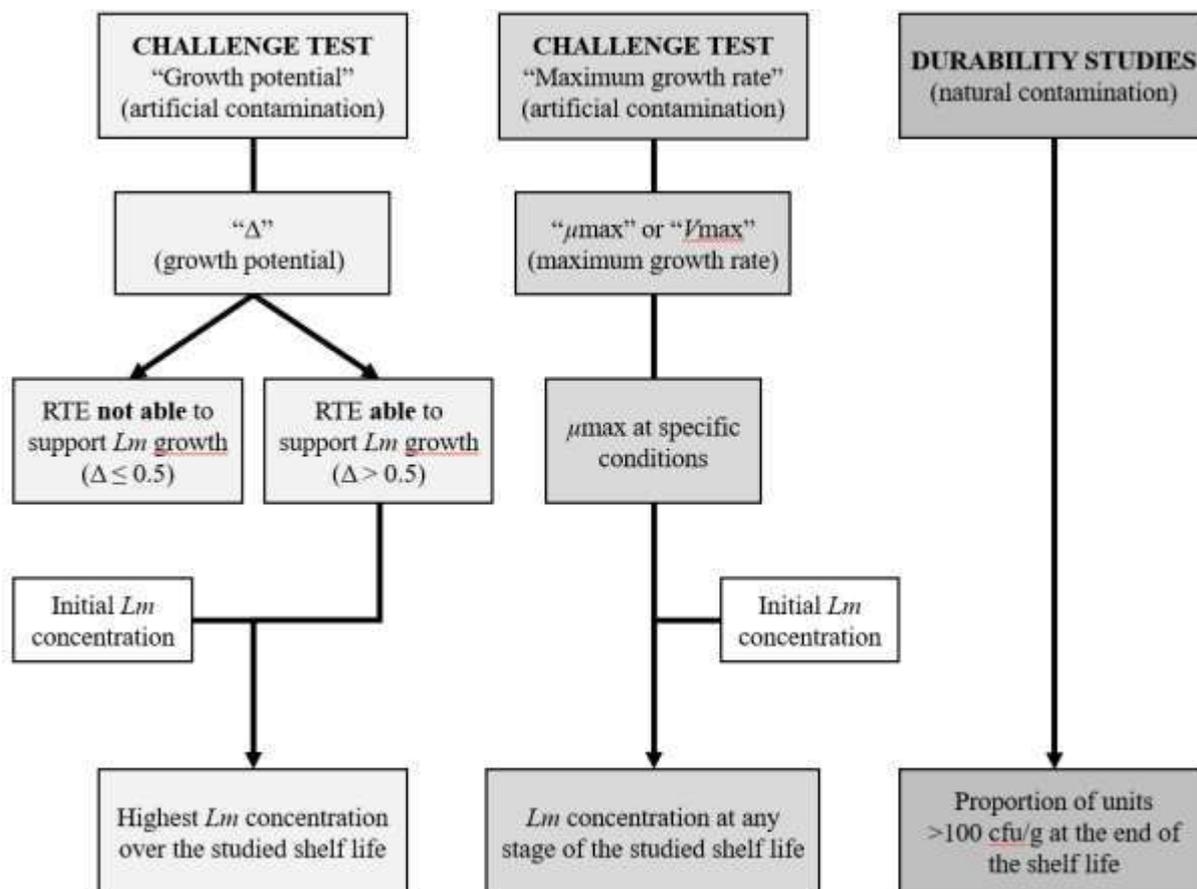


Imagen 1. Resultados obtenidos en cada tipo de estudio

En el Anexo 10.1 se presenta una tabla con los beneficios y limitaciones de cada tipo de estudio.

El “Documento de orientación técnica” está destinado principalmente a laboratorios que realizan ensayos de desafío y estudios de durabilidad de *Lm* en ALC en nombre de los operadores de empresas alimentarias.

El Documento de orientación técnica se aplica a ALC envasados¹ destinados al consumidor y a las colectividades², como se define en el Reglamento (UE) n° 1169/2011, para los que debe establecerse una «fecha de caducidad».

¹«alimento preenvasado»: cualquier unidad de venta presentada como tal al consumidor final y a las colectividades, constituida por un alimento y el envase en el cual haya sido acondicionado antes de ser puesto a la venta, ya recubra el envase al alimento por entero o solo parcialmente, pero de tal forma que no pueda modificarse el contenido sin abrir o modificar dicho envase; la definición de «alimento envasado» no incluye los alimentos que se envasan a solicitud del consumidor en el lugar de la venta o se envasan para su venta inmediata.

²«colectividades»: cualquier establecimiento (incluidos un vehículo o un puesto fijo o móvil), como restaurantes, comedores, centros de enseñanza, hospitales y empresas de suministro de comidas preparadas, en los que, como actividad empresarial, se preparan alimentos listos para el consumo por el consumidor final.

Los ensayos de desafío de ALC envasados deben realizarse utilizando el producto en su formato de envasado final, teniendo en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso. La vida útil del producto se establece en su versión envasada para la venta.

En el caso de los productos no envasados, es preciso tener en cuenta factores adicionales, tales como la higrometría, en el almacenamiento del producto en condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles. Por ende, se debe adaptar el protocolo experimental a este tipo de productos.

Para los productos destinados a su exposición a granel (por ejemplo, grandes bloques de queso, trozos de jamón o recipientes de ensaladas), las pruebas deben realizarse utilizando el envase convencional que suele suministrarse a restauración o consumidores (por ejemplo, el jamón se puede envolver con papel film, las ensaladas se pueden recoger en botes de plástico).

3 Referencias normativas

Se aplicará la versión más reciente del documento referenciado (inclusive cualesquiera modificaciones):

- Norma EN ISO 20976-1 «Directrices y requisitos para la realización de ensayos de desafío de productos alimenticios y piensos. Parte 1: ensayos de desafío para estudiar el potencial de crecimiento, el tiempo de latencia y la tasa máxima de crecimiento».
- EN ISO 11290-1 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. Parte 1: Método de detección.
- EN ISO 11290-2 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. Parte 2: Método de recuento;
- EN ISO 6887-1 ISO. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales;
- ISO/NP 23961, Microbiología de la cadena alimentaria. Determinación y uso de valores cardinales.

4 Definiciones

4.1 Alimentos listos para consumo (ALC)

Los alimentos listos para el consumo son alimentos destinados por el productor o el fabricante para el consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz que elimine o reduzca a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos. (Reglamento (CE) N.º 2073/2005).

Los alimentos listos para el consumo pueden contaminarse, pero el nivel y la frecuencia de contaminación varían y, por lo general, son bajos. Los alimentos en los que la *Lm* pueda sobrevivir o crecer son focos potenciales de listeriosis, cuando no se siguen las instrucciones de almacenamiento (temperatura/ tiempo) o de preparación que describe el operador de la empresa alimentaria en el envase.

Los ALC asociados a la listeriosis humana son, principalmente, «carne y productos cárnicos», «pescado y productos de pesca» y «productos lácteos». Siguen produciéndose brotes en todo el mundo, asociados a muchos vehículos alimentarios de los que antes no se informaba, incluidos los alimentos de origen vegetal, como las frutas frescas y mínimamente procesadas (melón, manzanas caramelizadas) y verduras o brotes. Los brotes de listeriosis también están relacionados con los cambios en los hábitos de consumo, tales como el uso de alimentos congelados para cocinar, pero que se usan descongelados (maíz congelado).

4.2 Vida útil de los ALC

La vida útil de un alimento se define como el periodo de tiempo en el que un producto permanece inocuo y cumple las especificaciones de calidad en condiciones razonablemente previsibles de almacenamiento, distribución y uso.

En virtud del Reglamento CE nº 2073/2005, la vida útil corresponde al periodo anterior a:

- la «fecha de caducidad», es decir, el último día en el que pueda usarse el alimento. En este caso, la vida útil se refiere a la seguridad alimentaria;

o

- la «fecha de duración mínima» o de «consumo preferente», es decir, la fecha límite hasta la cual el alimento conserva sus propiedades específicas en condiciones de almacenamiento adecuadas. Se refiere principalmente a la calidad del alimento (aspecto, olor, textura, sabor, etc.).

La vida útil microbiológica de un alimento corresponde al periodo de tiempo durante el cual el alimento se mantiene dentro de los límites microbiológicos cuantitativos predefinidos. Comienza en el momento en el que se produce/ envasa el alimento. La vida útil microbiana de un alimento es una medida de control de seguridad alimenticia que debe ser validada por los estudios que se establecen en el Anexo II del Reglamento (CE) N.º 2073/2005.

5 El papel de los operadores de empresas alimentarias y de los laboratorios

Los operadores de empresas alimentarias son responsables de llevar a cabo dichos estudios de vida útil y del cumplimiento de los criterios microbiológicos durante la vida útil de un producto (anexo 10.2). Pueden realizarse ensayos de desafío como parte de un estudio de vida útil. Los operadores de empresas alimentarias son responsables de establecer la vida útil en condiciones definidas que deben tener en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de transporte y almacenamiento a nivel de fabricación, venta al por menor y de consumo. El papel de los operadores de empresas alimentarias consiste en establecer un sistema de gestión de la seguridad alimentaria y facilitar datos pertinentes sobre las características de los productos, los procesos de producción y las condiciones de almacenamiento, teniendo en cuenta la variabilidad intrínseca vinculada al producto, al tratamiento y a las condiciones de almacenamiento.

Por su parte, los laboratorios deben diseñar y realizar los ensayos de desafío o estudios de durabilidad en base a la información que facilitan los operadores de empresas alimentarias. Los laboratorios deben contar con la experiencia necesaria o tener acceso a los conocimientos pertinentes en materia de microbiología alimentaria, ciencias de los alimentos, procesamiento de los alimentos y estadísticas. La experiencia estadística incluye la comprensión de la teoría de toma de muestras, diseño de experimentos y análisis estadístico de datos microbiológicos.

Los análisis de los ensayos de desafío deben realizarse siguiendo un sistema de garantía de calidad. Se recomienda utilizar un laboratorio con acreditación EN ISO/IEC 17025 para los métodos analíticos que se utilizan en el ensayo de desafío y, al menos, los métodos de detección y recuento de la *Lm*.

En el caso de los laboratorios no acreditados, el nivel de garantía de calidad mínimo esperado consiste en tener documentadas buenas prácticas de laboratorio, realizar sus propias pruebas de control de calidad metrológicas y haber participado de manera satisfactoria en pruebas de aptitud.

El papel del laboratorio consiste en presentar los resultados de los ensayos de desafío o de los estudios de durabilidad, incluyendo las conclusiones del comportamiento de la *Lm* en el producto analizado, en un informe (informe de ensayo de desafío o de estudio de durabilidad) que los operadores de empresas alimentarias puedan usar como parte del estudio de vida útil.

Por último, los operadores de empresas alimentarias serán responsables de interpretar los resultados y conclusiones del informe del laboratorio. Esta interpretación debe registrarse en el informe de estudio de vida útil, en el que también se incluirá información adicional (por ejemplo, el nivel de contaminación inicial del producto tras la producción, información sobre las características fisicoquímicas de los productos, información sobre el perfil de tiempo/temperatura de almacenamiento, información sobre el proceso de producción, etc.).

Los operadores de empresas alimentarias son responsables de poner a disposición de las AC los informes de los estudios de vida útil si estas así lo solicitan para su evaluación.

6 Ensayos de desafío (*Challenge test*)

Un ensayo de desafío o *challenge test* es un estudio de laboratorio que se utiliza para evaluar la seguridad microbiológica de un producto. Evalúa si un producto permite o no desarrollar *Listeria monocytogenes*.

En los alimentos, son numerosos los factores o combinaciones de factores que pueden repercutir en el crecimiento de *Lm*. Estos factores se dividen en parámetros intrínsecos y extrínsecos (anexo 10.3). Parámetros intrínsecos (relativos al propio alimento), tales como el pH, la actividad de agua (a_w), NaCl, contenido de humedad, microbiota de fondo, contenido nutricional y estructura del alimento, contenido de conservantes. Factores extrínsecos (relativos al entorno de almacenamiento del alimento), tales como la atmósfera gaseosa, la humedad relativa, el envasado y el tiempo/temperatura y las condiciones de almacenamiento.

Algunos de los factores que afectan al crecimiento de *Lm* pueden variar entre un lote (variabilidad intralote) o entre lotes (variabilidad interlote) y estas variabilidades deben abordarse antes de iniciar un ensayo de desafío.

6.1 Prerrequisitos antes de iniciar un ensayo de desafío

Antes de iniciar un ensayo de desafío, los operadores de empresas alimentarias deben poder facilitar al laboratorio la información relevante que corresponde al producto estudiado. El objetivo de este primer paso es múltiple y permite:

- Identificar los factores que pueden tener un impacto en el crecimiento de la *Lm* y priorizar las mediciones de dichos factores;
- Evaluar las fuentes de variabilidad de los factores que caracterizan el producto y el proceso productivo;
- Demostrar que los productos analizados durante los ensayos de desafío son representativos de la producción.

El laboratorio precisa la siguiente información de los productos:

- Descripción del producto (denominación comercial del producto, peso...), nueva formulación, nuevo producto o producto con historial de producción;
- Condiciones de procesamiento (al menos, las relevantes en el proceso productivo: por ejemplo, tratamiento térmico, secado, ahumado, maduración, troceado, picado, congelado, descongelación, salado, envasado, etc.);
- Composición del producto (etiquetado en el producto);
- Características del producto, inclusive la variabilidad entre y dentro de los lotes del producto. En determinadas categorías de alimentos, también resulta importante destacar que, si los valores de ciertas características varían a lo largo de la vida útil (por ejemplo, valores de pH en productos fermentados, quesos o valores a_w en jamón curado, quesos duros);

- Condiciones de envasado del producto final (incluyendo una foto del producto);
- Condiciones de almacenamiento durante la vida útil (teniendo en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de transporte y almacenamiento a nivel de fabricación, venta al por menor y de consumo);
- Vida útil, condiciones recomendadas (instrucciones en el envase) y condiciones de uso razonablemente previsibles del producto.

En el anexo 10.4 se recoge un diagrama de flujo en el que se describen los pasos esquemáticos, desde el historial de datos de los operadores de empresas alimentarias, hasta las pruebas de laboratorio.

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

A continuación, se incluyen ejemplos de cómo evaluar, en función del volumen disponible del histórico de datos, si las características de los lotes estudiados son representativas de la variabilidad observada en condiciones de producción normales.

- Ejemplo 1 = situación ideal en la que el operador de empresas alimentarias dispone de numerosos datos (producto fabricado durante varios años)

Recopilar datos registrados por el operador de empresas alimentarias a nivel de fabricación a lo largo de los años ofrece información valiosa sobre la distribución de las mediciones de pH en el producto comercializado (Imagen 2).

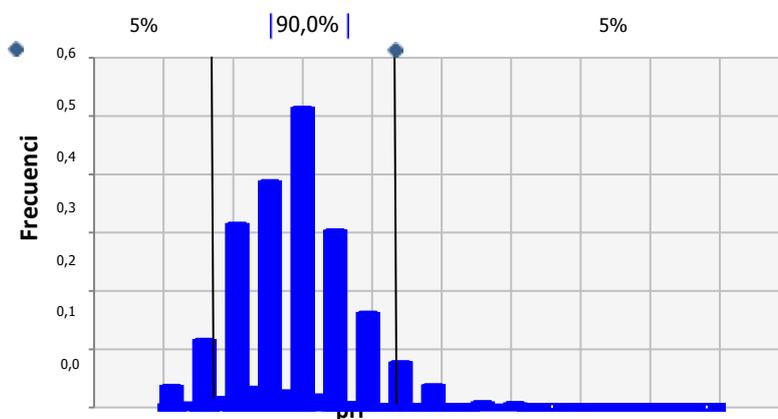


Imagen 2. Histograma de valores de pH de un ALC a partir del histórico de datos

En función de esta distribución de mediciones de pH, los controles alimenticios de los ensayos de desafío pueden considerarse representativos de la variabilidad del proceso de producción, si sus valores de pH se encuentran dentro del rango del 90 % del histórico de datos.

- Ejemplo 2 = situación en la que el operador de empresas alimentarias dispone de datos limitados.

El operador de empresas alimentarias ha caracterizado tres lotes de un producto alimentario con una única medición por lote (Tabla 3).

Tabla 3. Tabla de características fisicoquímicas y microbiológicas de un ALC

	PH	aw	Conservante	Total microbiota
Lote 1	5,5	0,98	1,0%	3,104
Lote 2	5,1	0,98	1,5%	9,104
Lote 3	5,2	0,98	1,2%	5,104

En este caso, no es posible evaluar si los lotes analizados serán representativos del proceso de producción. No es fiable caracterizar un producto a partir de una cantidad de datos tan limitada. Al menos, es necesario contar con 5 valores de cada factor por lote.

6.2 Ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento

6.2.1 Introducción

Un ensayo de desafío microbiológico para evaluar el potencial de crecimiento (Δ) es un estudio de laboratorio que mide el crecimiento de la *Lm* en alimentos contaminados de manera artificial que se almacenan en condiciones previsibles a nivel de fabricación, venta al por menor y de consumo. En un ensayo de desafío deben quedar reflejadas las condiciones previsibles que quepa esperar que se produzcan en la cadena de frío, inclusive las condiciones de almacenamiento entre producción y consumo. El periodo de ensayo comienza el día en el que tiene lugar la contaminación y finaliza al final de la vida útil.

El potencial de crecimiento (Δ) es la diferencia entre la concentración de *Lm* más alta que se haya observado en \log_{10} ufc/g durante el ensayo y la concentración inicial de *Lm* en \log_{10} ufc/g al comienzo del ensayo.

$$\text{Potencial de crecimiento } (\Delta) = (\text{concentración de } Lm \text{ más alta observada}) - (\text{concentración de } Lm \text{ inicial})$$

En el marco de la implantación del Reglamento (CE) N.º 2073/2005, el Δ puede utilizarse para:

- Clasificar un alimento:
 - cuando $\Delta > 0,5 \log_{10}$ ufc/g, el alimento se clasifica en «Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *Lm*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales» (categoría 1.2),
 - cuando $\Delta \leq 0,5 \log_{10}$ ufc/g, el alimento se clasifica en «Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *Lm*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales» (categoría 1.3),
- Cuantificar el crecimiento de la *Lm* en un alimento de categoría 1.2 en función de las condiciones razonablemente esperables entre producción y consumo.

En un ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento, pueden aplicarse estreses o adaptaciones a las suspensiones celulares para recrear el estado fisiológico de las bacterias con mayor probabilidad de contaminar el producto.

Algunos ejemplos de ellos son:

- Las cepas de *Lm* que puedan contaminar productos cárnicos cocidos, en lonchas y envasados proceden de un entorno de fabricación refrigerado y, en consecuencia, las cepas pueden adaptarse y crecer en condiciones frías;
- En relación con otros alimentos procesados, como el paté procesado a alta presión (HPP) no puede esperarse alcanzar la inactivación completa de *Lm* presente y, si se pretende determinar la vida útil tras el tratamiento de HPP, las cepas de *Lm* utilizadas pueden exponerse a tratamiento de HPP como parte de la preparación del inóculo.

El inconveniente de este ensayo es la falta de flexibilidad en la interpretación, puesto que los resultados tan solo son válidos para el producto estudiado en las condiciones especificadas, por lo que deben realizarse experimentos nuevos cada vez que se produce un cambio (por ejemplo, uso de diferentes perfiles de tiempo/temperatura, cambio de ingredientes o receta).

6.2.2 Protocolo de un ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento

6.2.2.1 Elección de lotes

Por norma, para determinar la vida útil microbiológica de un ALC deben analizarse, al menos, 3 lotes para poder captar la variabilidad interlote.

Los lotes deben enviarse al laboratorio a la mayor brevedad posible tras la producción (es decir, el día de producción o el siguiente) para evitar que se alteren las características alimentarias entre el día de producción y el día de inoculación (ver también el apartado 6.2.2.4).

Para contabilizar la variación del proceso de producción y del producto, se recomienda analizar tres lotes que se hayan producido en fechas diferentes. Implica, prácticamente, realizar tres ensayos de desafío diferentes.

Nota: En los casos en los que se produzcan diferentes lotes en un mismo día y en los que la variabilidad entre lotes se cubra en un día (deberá justificarse), podrá aceptarse el análisis de los 3 lotes producidos el mismo día.

6.2.2.2 Elección de cepas

Para contabilizar la variación en el crecimiento y supervivencia entre cepas de *Lm*, debe realizarse un ensayo de desafío con una mezcla de cepas de *Lm*. Se deben utilizar las mismas cepas de *Lm* en los tres lotes.

El crecimiento de las cepas de *Lm* varía en función del alimento y de las condiciones de almacenamiento estudiadas. Para ayudar al laboratorio a encontrar y elegir cepas de *Lm*, el EURL *Lm* ha establecido un conjunto de cepas de *Lm* aisladas procedentes de diferentes orígenes (carne, pescado, lácteos y entorno). Estas cepas se han caracterizado por sus características de crecimiento (μ máx. se ha determinado en pH extremos, aw y temperatura (anexo 10.5). En este anexo se incluyen también ejemplos de selección de cepas del EURL *Lm*.

El conjunto de cepas del EURL *Lm* está disponible para los LNR y, en consecuencia, estos pueden facilitarlo a los laboratorios nacionales si así lo solicitan.

Las cepas de *Lm* deben almacenarse en el laboratorio mediante métodos que minimicen o eliminen las mutaciones que pueden afectar a sus características de crecimiento o supervivencia. El laboratorio encargado de la ejecución de los ensayos de desafío debe comprobar con frecuencia las características de crecimiento y de secuenciación bioquímica y molecular.

6.2.2.3 Preparación del inóculo

La normalización de la preparación del inóculo resulta especialmente importante para poder inocular el ALC a la concentración esperada de 100 ufc/g o ml (rango de 50 a 200 ufc/g) (en el anexo 10.6 se explica un ejemplo de cálculo).

Para estar listos para inocular el lote el día de llegada al laboratorio, los subcultivos para la preparación del inóculo deben realizarse con antelación. El volumen total de la suspensión de inóculo preparado debe ser suficiente para inocular todas las unidades del ensayo.

6.2.2.4 Inoculación de unidades de ensayo

La inoculación de unidades de ensayo es un paso crítico en la ejecución de un ensayo de desafío. Debe realizarse a la mayor brevedad posible tras la producción del lote, es decir, en un plazo de 2 días. En caso de que exista un retraso entre el transporte de las muestras al laboratorio, o si el producto tiene una vida útil larga (por ejemplo, más de 6 semanas), el retraso entre el día de producción y el inicio del ensayo de desafío podría ser superior a 2 días. Cuando esto sucede, debe demostrarse que el tiempo entre la producción e inoculación no afecta a la estructura, a las características fisicoquímicas y a la flora microbiana del producto.

En un ensayo de desafío, el proceso de inoculación de *Lm* debe garantizar que se distribuye de forma homogénea en el alimento, aunque pueda no ser el caso en la realidad. La desviación estándar del recuento de *Lm* obtenida en el día 0 (el día de inoculación) de las tres réplicas debe calcularse y debe ser inferior a 0,3 log ufc/g. En el supuesto de que esta desviación estándar fuese superior, no se aceptará el ensayo de desafío para el lote analizado y será preciso realizar un nuevo ensayo de desafío en otro lote.

Pueden utilizarse diferentes técnicas de inoculación para contaminar los ALC de manera artificial:

- O bien se saca el alimento de su envase, se inocula y se vuelve a envasar en concentraciones de gases similares a un envase sin abrir (envase de consumidor). En este caso, el laboratorio usará bandejas y películas específicas con propiedades de barrera similares en comparación con el envase original. El ALC puede inocularse:
 - en profundidad: para alimentos que se consideren homogéneos (por ejemplo, alimentos triturados) o alimentos preparados mezclando varios materiales (por ejemplo, ensalada mixta).
 - en la superficie: para replicar la contaminación de una parte específica durante el proceso (por ejemplo, productos contaminados durante el troceado).

En relación con aquellos productos que tengan varios componentes o capas, deben inocularse uno o varios componentes relevantes en relación con la contaminación con *Lm* o las interrelaciones entre componentes (por ejemplo: sándwiches).

- O el alimento se mantiene en su envase inoculando a través de un septo que se cubre de inmediato con un segundo septo para mantener las condiciones gaseosas exactas.

En el anexo 10.7 se detallan algunos ejemplos de diferentes técnicas de contaminación. Pueden emplearse otras técnicas si se puede demostrar que el contenido de humedad no ha variado y no afectará a las propiedades intrínsecas del alimento (por ejemplo, inmersión).

Cualquiera que sea la técnica de contaminación utilizada, es conveniente probarla, antes de la inoculación con *Lm*, mediante la utilización un colorante diluido para visualizar la dispersión del volumen inoculado.

En lo que respecta a los productos desenvasados y que se hayan vuelto a envasar en una atmósfera modificada, debe prestarse atención especial para garantizar que el volumen de espacio de cabeza y la composición gaseosa de las muestras del ensayo de desafío replican el producto comercial de la manera más fiel posible.

Nivel de contaminación

El nivel de contaminación objetivo se sitúa próximo a los 100 ufc/g (rango de 50 a 200 ufc/g).

Este nivel de contaminación reduce el efecto de la medición de incertidumbre asociada a cifras bajas. En casos concretos, tales como la inoculación de productos fermentados, puede utilizarse un nivel de contaminación de *Lm* más elevado para poder enumerar y seguir de manera más sencilla el crecimiento de la *Lm* entre otras cepas en el agar selectivo.

6.2.2.5 *Número de unidades y número de puntos de muestreo*

Consúltese la EN ISO 20976-1 en lo que respecta a:

- **El número de unidades que deben prepararse** (número de unidades de ensayo que deben inocularse, número de unidades de control y muestras de control alimentario);
- **El número de puntos de muestreo.**

Ver también el anexo 10.8 del presente documento.

6.2.2.6 *Condiciones de almacenamiento*

Las condiciones de almacenamiento aplicadas durante el ensayo de desafío (incubación de las unidades de ensayo) deben corresponder con las condiciones normales en las que sea más posible que se utilice el producto, hasta el final de la vida útil. Se debe incluir el rango de temperatura esperado en la cadena de frío, desde la fabricación hasta la venta al por menor, el almacenamiento en comercio y en consumo.

La temperatura durante la vida útil es una parte esencial de un ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento (anexo 10.9). Es responsabilidad de los operadores de empresas alimentarias asegurar que las condiciones de almacenamiento empleadas sean realistas, teniendo en cuenta que las temperaturas de almacenamiento etiquetadas en el envase no siempre pueden mantenerse a lo largo de la cadena de frío (desde producción hasta consumo). En el supuesto de que se utilizase una temperatura de almacenamiento inapropiada (temperatura inferior a la que suele producirse) durante el ensayo de desafío, podría infravalorarse el crecimiento de la *Lm* y sobrestimarse la duración de la vida útil.

o Temperatura y duración

La temperatura(s) utilizada para determinar la vida útil del producto tiene (tienen) que estar debidamente justificada y documentada por los operadores de empresas alimentarias.

- En la primera fase de la cadena de frío (desde fabricación hasta la llegada al expositor), cuando los operadores de empresas alimentarias disponen de sus propios datos, se prefiere el uso de esta información. En este caso, se utilizará el percentil 95 de la observación de datos de los operadores de empresas alimentarias. En el caso de no disponer de datos, se utilizará la temperatura por defecto que figura en la Tabla 4.
- En la segunda fase (expositor en tienda) y en la tercera fase (almacenamiento por parte del consumidor) de la cadena de frío, en los casos en los que se disponga de información, se prefiere el uso de datos nacionales donde se encuentra la fase de la cadena de frío. En este caso, se utilizará el percentil 95 de la observación de datos. En el caso de no disponer de datos, se utilizará la temperatura por defecto que figura en la Tabla 4.

Tabla 4. Diagrama de flujo de las condiciones de almacenamiento durante la cadena de frío

Fase de la cadena de frío	Temperatura de almacenamiento (incubación)			Duración de almacenamiento (incubación)			
				Vida útil (VU) □ 21 días		Vida útil (VU) > 21 días	
A nivel de fabricación	Temperatura justificada por la información detallada*	O si se desconoce	7°C	Duración justificada por la información detallada	O si se desconoce	1/3 VU	7 días
A nivel minorista	Temperatura justificada por la información detallada**	O si se desconoce	7°C	Duración justificada por la información detallada	O si se desconoce	1/3 VU	1/2 (VU-7)
A nivel de consumidor	Temperatura justificada por la información detallada**	O si se desconoce	10°C	Duración justificada por la información detallada	O si se desconoce	1/3 VU	1/2 (VU-7)

* Temperatura justificada por la información detallada: percentil 95 de la observación de datos de los operadores de empresas alimentarias

** Temperatura justificada por la información detallada: percentil 95 de la observación para el país en el que se encuentre la fase de la cadena de frío.

6.2.2.7 Medición de los parámetros fisicoquímicos

Es preciso conocer las características fisicoquímicas del producto. El pH y a_w son fundamentales. En lugar del a_w , pueden utilizarse el contenido NaCl y [humedad o contenido en materia seca] para aquellos productos en los que el NaCl sea el factor que controle la actividad en agua. A partir de estos datos, se calculará en primer lugar el contenido de sal en la fase acuosa WPS (en g/100ml):

$$WPS = \frac{\text{salt content (in g per 100g)}}{\text{moisture content (in ml per 100g)} \times \text{salt content (in g per 100g)}} \times 100$$

and then estimate the a_w with the following equation:

$$a_w = 1 - 0.0052471 \times WPS - 0.00012206 \times WPS^2$$

Esta fórmula (Resnik, Chirife 1988) (Gimenez, Dalgaard, 2004) se basa en el contenido de sal, pero otros componentes, tales como el contenido de azúcar, pueden modificar los valores de a_w y, en ese caso, no podrá utilizarse esta fórmula.

Para calcular el contenido de la fase acuosa a partir del porcentaje de materia seca, el porcentaje de NaCl en el producto y para calcular la actividad en agua puede utilizarse la calculadora disponible en el *software* FSSP (Food Safety and Spoilage Predictor) (gratuita *online*: (anexo 10.10).

Asimismo, deberán medirse otros factores (tales como ácidos orgánicos) en la medida en que resulten relevantes para controlar el crecimiento de *Lm* en el producto (en el anexo 10.11 se incluyen ejemplos).

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

Cuando se midan las propiedades fisicoquímicas de un producto, debe analizarse una parte representativa del producto, teniendo en cuenta los lugares en los que se espera encontrar *Lm* en el producto. A continuación, se incluyen algunos ejemplos:

- Comidas con varios componentes (productos compuestos):
Deberá determinarse la hipótesis menos favorable y se utilizará en análisis posteriores cuando se separen los diferentes componentes en el envase del alimento y no interactúen entre sí. Cuando los componentes individuales puedan interactuar entre sí, el crecimiento de *Lm* se verá afectado por el microentorno, que deberá tenerse en cuenta.
- Pescado ahumado:
Es más probable que la *Lm* se encuentre en la superficie del producto que en su interior. Es por ello por lo que las características químicas de la superficie del producto cobran una importancia especial. Estas características pueden variar ligeramente de las del interior del producto.

Cuando se externaliza la medición de estos parámetros fisicoquímicos, es necesario aportar, al menos, dos unidades de control adicionales especialmente para este fin.

o Atmósfera gaseosa

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

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

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

Estos análisis deben realizarse sobre una muestra de control al comienzo (t_0) y al final (t_{final}) del análisis de una muestra de alimento (sin septo) y de una unidad de control (con septo) para comprobar la estanqueidad del envase durante todo el periodo de ensayo. (anexo 10.12).

o Temperatura

La medición de las temperaturas de almacenamiento de las unidades de ensayo debe registrarse durante el ensayo utilizando un registrador de datos térmicos en una unidad de ensayo de control específica que se encuentre en la misma incubadora y lo más cerca posible de las unidades de ensayo restantes.

6.2.2.8 Análisis microbiológicos

Las suspensiones iniciales se preparan, en la medida de lo posible, utilizando la totalidad de la unidad de ensayo contaminada para poder registrar la heterogeneidad del producto (anexo 10.13).

o Métodos de detección y recuento de la *Lm*

De conformidad con el Anexo I del Reglamento (CE) N.º 2073/2005, los métodos de detección y recuento de *L. monocytogenes* son, respectivamente, la EN ISO 11290-1 y la EN ISO 11290-2. Dado que las unidades de ensayo se contaminan de forma artificial con *Lm*, no es necesario completar el paso de confirmación cuando se realiza el recuento.

De conformidad con el Artículo 5 de dicho reglamento, se autorizará el uso de métodos analíticos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto del método de referencia y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140-2 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados. Se autorizarán otros métodos en función de los protocolos internacionalmente aceptados y su uso autorizado por parte de la Autoridad competente.

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

A partir de los análisis de recuento de *Lm*, puesto que el nivel de contaminación objetivo se sitúa alrededor de 100 ufc/g (rango 50-200 ufc/g), se recomienda:

- Reducir el nivel del recuento a 10 ufc/g, de conformidad con la EN ISO 11290-2:
 - utilizando 1 ml de la suspensión en 3 placas de Ø 90 mm o en 1 placa grande de Ø 140 mm,
 - o, para métodos alternativos validados, vertiendo 1 ml en una placa de Ø 90 mm.
- Aplicar un método con un nivel de detección inferior para el recuento que la EN ISO 11290-2, siempre que esté validado y sea apto para el recuento de dichos niveles inferiores con precisión suficiente.

Teniendo en cuenta el nivel de recuento (objetivo entre 50-200 ufc/g), para evitar niveles bajos (menos de 10 colonias en una placa de Petri, según la EN ISO 7218), en los recuentos de colonias, se puede:

- o bien disminuir el factor de dilución de la suspensión inicial (por ejemplo, 1/5 en lugar de 1/10),
- o incrementar el volumen de la suspensión de las placas (por ejemplo, 2 ml en 2 placas de Ø 140 mm o 2 ml en 6 placas de Ø 90 mm).

La microbiota de fondo que puede tenerse en cuenta incluye recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (EN ISO 4833) o microbiota específica de los alimentos (por ejemplo, bacterias del ácido láctico, *Pseudomonas* spp, levaduras o mohos). Los métodos que se utilizan en el recuento de esta microbiota específica siguen las normas EN ISO o normas nacionales correspondientes para el organismo o tipo de alimento.

6.2.2.9 Cálculo del potencial de crecimiento

Para cada lote, el potencial de crecimiento Δ se calcula mediante la fórmula:

$$\Delta = \log_{\text{máx.}} - \log i$$

donde $\log_{\text{máx.}}$ es el valor superior entre el recuento de *Lm* obtenido de, al menos, los 4 puntos de muestreo (salvo la muestra en t_0), cuando se analiza una unidad de ensayo por punto de muestreo.

Cuando se analiza más de una unidad de ensayo por punto de muestreo, $\log_{\text{máx.}}$ es el valor medio más alto obtenido de cada uno de dichos 4 puntos de muestreo.

Log i hace referencia al valor medio de las 3 unidades de ensayo analizadas en el momento cero (t_0)

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

En este primer ejemplo, que representa la mayoría de los casos, se analizaron 3 lotes (Tabla 5). Para cada lote, se extendieron 5 puntos de muestreo durante el ensayo y se analizó 1 unidad de prueba en cada punto de muestreo.

Tabla 5. Cálculo del potencial de crecimiento de 3 lotes, 5 puntos de muestreo, 1 unidad de prueba por punto de muestreo.

	Momento 0 (t_0)		Momento 1	Momento 2	Momento 3	Momento 4	Δ lote	Δ Alimento
	[Lm] log10 ufc/g	Media \pm de*	[Lm] log10 ufc/g	[Lm] log10 ufc/g	[Lm] log10 ufc/g	[Lm] log10 ufc/g		
lote 1	2,15 2,18 2,08	2,14 \pm 0,05	2,15	2,11	2,04	2,18	2,18 - 2,14 = 0,04	0,08
lote 2	2,11 2,15 2,04	2,10 \pm 0,06	2,18	2,10	2,11	2,08	2,18 - 2,10 = 0,08	
lote 3	2,16 2,26 2,18	2,20 \pm 0,05	2,20	2,14	2,24	2,06	2,24 - 2,20 = 0,04	

*de: desviación estándar

En este primer ejemplo, la desviación estándar (de) entre los 3 resultados en el momento 0 (t_0) para el lote 1, 2 y 3 es de 0,05, 0,06 y 0,05 \log_{10} , respectivamente. La inoculación se ha completado correctamente ($<0,3 \log_{10}$), por lo que pueden utilizarse los resultados de los ensayos de desafío obtenidos para evaluar el potencial de crecimiento.

En este ejemplo, el valor « Δ » más alto de los 3 lotes es 0,08 \log_{10} .

El potencial de crecimiento se sitúa por debajo del criterio 0,5 \log_{10} que determina si el ALC puede o no favorecer el crecimiento de Lm . En consecuencia, este ALC no favorece el crecimiento de Lm y puede clasificarse dentro de la categoría 1.3 del Reglamento (CE) n° 2073/2005.

Nota: Donde se analizan 3 lotes de forma simultánea, basta con 1 punto de muestreo en t_0 para calcular la desviación estándar.

En este segundo ejemplo se presentan los resultados de un ensayos de desafío de 3 lotes, 5 puntos de muestreo y 3 unidades de ensayo por punto de muestreo (debido a la variabilidad entre los parámetros fisicoquímicos en el producto estudiado) (Tabla 6).

Tabla 6. Cálculo del potencial de crecimiento de 3 lotes, 5 puntos de muestreo, 3 unidades de prueba por punto de muestreo.

	Momento 0 (t_0)		Momento 1		Momento 2		Momento 3		Momento 4		Δ lote	Δ
	[Lm]	Media \pm de*	[Lm]	Media	[Lm]	Media	[Lm]	Media	[Lm]	Media		
lote 1	2,10 2,28 1,80	2,06 \pm 0,24	2,90 1,98 3,10	2,66	3,00 3,86 3,95	3,60	4,12 4,24 4,18	4,18	4,98 4,75 4,73	4,82	4,82 -2,06 = 2,68	3,30
lote 2	1,48 2,36 2,18	2,00 \pm 0,46										
lote 3	2,16 2,26 2,18	2,20 \pm 0,05	1,80 3,00 3,10	2,63	3,90 3,95 3,97	3,94	4,20 4,31 4,50	4,34	5,80 5,30 5,40	5,50	5,50 -2,20 = 3,30	
lote 4	2,20 2,04 1,96	2,06 \pm 0,12	2,28 2,72 2,85	2,62	3,14 3,53 3,26	3,31	3,25 4,0 3,11	3,45	4,42 4,18 4,50	4,36	4,36-2,06 = 2,30	

*de: desviación estándar

En el momento 0, la desviación estándar del lote 2 es igual a 0,46 \log_{10} . Es superior a la tolerancia de 0,3 \log_{10} , lo que indica que la inoculación no se realizó de manera correcta.

En consecuencia, se ha finalizado el ensayo de desafío del lote 2, puesto que no es aceptable iniciar un ensayo de desafío con esta diferencia entre las muestras inoculadas. Se reanudó un ensayo de desafío en otro lote (denominado lote 4 en la mesa).

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de desafío efectuados sobre el lote 1, lote 3 y lote 4 de la Tabla 6, puede analizarse el potencial de crecimiento de Lm en el producto analizado.

El valor « Δ » más alto de los 3 lotes es 3,30 \log_{10} . El potencial de crecimiento se encuentra por encima del criterio 0,5 \log_{10} que determina si un ALC puede o no favorecer el crecimiento de Lm . En consecuencia, este ALC favorece el crecimiento de Lm y puede clasificarse dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) n° 2073/2005.

6.2.2.10 Aplicación de resultados

Los operadores de empresas alimentarias son responsables del uso de los resultados de los ensayos de desafío. Los resultados de un ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento informarán a los operadores de empresas alimentarias de los siguientes dos puntos:

- La capacidad del producto de favorecer el crecimiento de L_m

La primera pregunta que debe resolverse es si el alimento favorece o no el crecimiento de L_m si:

- Δ es inferior o igual al límite de $0,5 \log_{10}$, se asume que el alimento no favorece el crecimiento de L_m (Categoría 1.3 del Reglamento (CE) N.º 2073/2005).
- Δ es superior al límite de $0,5 \log_{10}$, por lo que se asume que el alimento favorece el crecimiento de L_m (Categoría 1.2 del Reglamento (CE) N.º 2073/2005).

- La estimación del crecimiento de L_m a partir del valor obtenido de potencial de crecimiento

En los casos en los que se asume que el alimento puede favorecer el crecimiento de L_m , el valor Δ puede utilizarse para estimar el crecimiento (se ejemplifica a continuación):

Mayor concentración de L_m durante la vida útil del alimento = concentración inicial de L_m + Δ

En la práctica, para determinar si se sobrepasa o no el límite de 100 ufc/g durante toda la vida útil del alimento, puede utilizarse la mayor concentración de L_m que se obtenga del cálculo anterior.

- Ejemplos

PREGUNTA 1: ¿El alimento favorece el crecimiento de L_m , según el valor Δ ?

En el ejemplo 1, el potencial de crecimiento es:

$$\Delta = 0,08 \log_{10}$$

Si Δ se encuentra por debajo de $0,5 \log_{10}$, se asume que el alimento no favorece el crecimiento de L_m . Puede clasificarse dentro de la categoría 1.3 del Reglamento (CE) n° 2073/2005

En el ejemplo 2, el potencial de crecimiento es:

$$\Delta = 3,30 \log_{10}$$

Si Δ es muy superior a $0,5 \log_{10}$, se entiende que el alimento favorece el crecimiento de L_m y se clasifica dentro de la categoría 1.2 del Reglamento (CE) n° 2073/2005.

Así, para garantizar que la contaminación de L_m no excederá el límite de $2 \log$ ufc/g al final de la vida útil, la concentración inicial de L_m (C_i) debe ser muy baja, esto es, por debajo de $0,05 \log$ ufc/g ($C_i = 2,0 - 3,30 = -1,3 \log$ ufc/g)

PREGUNTA 2: ¿Cuál es la mayor concentración de Lm a lo largo de toda la vida útil del producto, a partir del potencial de crecimiento obtenido?

Ejemplo 1: El potencial de crecimiento es:

$$\Delta = 0,7 \log_{10}$$

la concentración inicial de Lm en el producto es $C_i = 1 \log_{10} \text{ ufc/g}$ (10 ufc/g)

Si Δ es superior a $0,5 \log_{10}$, se asume que el alimento favorece el crecimiento de Lm . Este valor Δ se puede utilizar en cálculos posteriores. La mayor concentración de Lm durante la vida útil del alimento puede estimarse a partir de la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{mayor concentración de } Lm &= \text{concentración inicial de } Lm + \Delta \\ \text{mayor concentración de } Lm &= 1 \log_{10} \text{ ufc/g} + 0,70 \log_{10} = 1,70 \log_{10} \text{ ufc/g} \text{ (por} \\ &\text{debajo del límite normativo de } 2 \log_{10} \text{ ufc/g)} \end{aligned}$$

6.2.2.11 Informe de ensayo

Consúltese la EN ISO 20976-1 en relación a todos los puntos que deben incluirse en el informe de ensayo.

Es importante mencionar en el informe de ensayo que los resultados de los ensayos de desafío sobre el potencial de crecimiento se aplican únicamente al producto analizado en las condiciones de almacenamiento (tiempo/temperatura) aplicadas. Cualquier cambio en la receta del producto, en el proceso productivo o en las condiciones de almacenamiento (tiempo/temperatura) invalidaría los resultados del estudio de vida útil, por lo que sería necesario repetirlo.

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

El aprovechamiento de los datos (cuando los facilite el laboratorio competente) no entra dentro del alcance de este informe de ensayo. Debe formar parte del informe de estudio de vida útil que preparen los operadores de empresas alimentarias.

6.3 Ensayos de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento

6.3.1 Introducción

Un ensayo de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento es un estudio de laboratorio en el que se estima el crecimiento de *Lm* en un alimento contaminado de forma artificial con una cepa de *Lm* cada vez y que se almacena a temperatura constante (normalmente, entre 6 y 10 °C) durante el estudio.

La velocidad máxima de crecimiento $\mu_{\text{máx.}}$ es el parámetro cinético que caracteriza el incremento de la población de *Lm* en la fase exponencial de la curva de crecimiento en una escala logarítmica natural (Ln).

A partir de la curva de crecimiento experimental que se obtenga al trazar la concentración de *Lm* (expresada en \log_{10} ufc/g) en función del tiempo (expresado en horas o días), se obtiene la velocidad máxima de crecimiento $V_{\text{máx.}}$.

La relación para pasar de un valor a otro es $\mu_{\text{máx.}} = V_{\text{máx.}} \cdot \text{Ln}(10) = V_{\text{máx.}} \cdot 2,3$.

En las publicaciones científicas y en la mayoría de las herramientas predictivas en microbiología, la velocidad máxima de crecimiento suele expresarse como $\mu_{\text{máx.}}$, para evitar confusiones es esencial prestar atención a las unidades.

La duración de un ensayo de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento puede no coincidir con la duración de la vida útil del producto. Su duración está definida por el tiempo necesario para trazar la curva de crecimiento a la temperatura seleccionada.

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

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

6.3.2 Protocolo de un ensayo de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento

Nota: En relación con los apartados «Inoculación de unidades de ensayo» y «Medición de los parámetros fisicoquímicos», consúltese la parte sobre el potencial de crecimiento, puesto que son idénticos. Las secciones que figuran a continuación son específicas para el protocolo para evaluar la velocidad máxima de crecimiento.

6.3.2.1 Número de lotes

Por norma, para determinar la vida útil microbiológica de un ALC deben analizarse, al menos, 3 lotes para poder captar la variabilidad interlote.

No obstante, a partir de la herramienta de cálculo «Calculadora de variabilidad fisicoquímica interlote», disponible en <http://standards.iso.org/iso/20976/-1/ed-1/en>, de la Norma EN- ISO 20976-1, se pueden realizar ensayos de desafío utilizando un único lote siempre que:

- los operadores de empresas alimentarias puedan ofrecer datos sobre los factores que caractericen un producto del lote (variabilidad intralote) y entre los lotes (variabilidad interlote);
- los parámetros fisicoquímicos, el pH y el a_w sean los factores principales que repercutan en el crecimiento de *Lm* en el producto;
- se considere que la repercusión de la variabilidad interlote de dichos parámetros fisicoquímicos sobre el crecimiento de la *Lm* no sea relevante (según los resultados de la herramienta de cálculo).

La herramienta de cálculo solo puede utilizarse en ensayos de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento.

6.3.2.2 Elección de cepas

Se utiliza una única cepa por ensayo de desafío, por lo que es importante seleccionar una cepa de la que se conozcan sus características de crecimiento y que resulte adecuada para el tipo de producto estudiado.

Esta cepa puede elegirse entre el conjunto de cepas del EURL *Lm*, clasificadas en función de su velocidad máxima de crecimiento a bajas temperaturas, pH y a_w . Puede solicitarse a los Laboratorios nacionales de referencia de *Lm*.

Se recomienda utilizar cepas clasificadas por sus valores cardinales (según la norma ISO/NP 23961 sobre la «Determinación y uso de valores cardinales», que aún se encuentra en fase de desarrollo). Utilizar estas cepas permitirá predecir de forma más precisa el crecimiento de la cepa en el alimento estudiado en diferentes condiciones ambientales que no se evalúen durante el ensayo de desafío.

6.3.2.3 Preparación del inóculo

Las condiciones de preparación del inóculo son idénticas a las que se han descrito en apartados anteriores para los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento, con la salvedad de que la cepa se cultiva y utiliza individualmente.

6.3.2.4 Inoculación de unidades de ensayo

Las condiciones para la inoculación de unidades de ensayo son idénticas a las que se han descrito en apartados anteriores para los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento, con la salvedad de que la inoculación se lleva a cabo con una única cepa y no con una mezcla de cepas para cada curva de crecimiento.

6.3.2.5 *Número de unidades y número de puntos de muestreo*

Consúltese la EN ISO 20976-1 en lo que respecta a:

- **El número de unidades que deben prepararse** (número de unidades de ensayo que deben inocularse, número de unidades de control y muestras de control alimentario);
- **El número de puntos de muestreo.**

Ver también el anexo 10.14 del presente documento.

6.3.2.6 *Condiciones de almacenamiento*

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

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

6.3.2.7 *Análisis microbiológicos*

Consúltese el apartado 6.2.2.8 la parte relativa al potencial de crecimiento, excepto para la detección de *Lm* en la muestra de control alimentario en el momento 0. Cuando se detecte *Lm* en el lote estudiado en la muestra de control de alimentos, se detendrá el ensayo de desafío (debido a la inoculación de una sola cepa en un ensayo de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento).

6.3.2.8 *Cálculo de la velocidad máxima de crecimiento*

Para cada curva de crecimiento (una curva de crecimiento por lote), la velocidad máxima de crecimiento puede estimarse de manera sencilla ajustando un modelo primario (regresión no lineal) en todos los puntos experimentales de la curva de crecimiento. Este ajuste puede realizarse utilizando un *software* microbiológico predictivo gratuito, por ejemplo: DMFit del *software* ComBase (<https://www.combase.cc/index.php/en/>) o Ajuste de curvas de Sym'Previus (<https://symprevius.eu/en/>).

La velocidad máxima de crecimiento estimada del producto analizado que se determine a partir del ensayo de desafío es equivalente a la media (expresada con su desviación estándar) de los valores de velocidad máxima de crecimiento que se obtengan de las curvas de crecimiento (al menos una por lote).

Para trazar la curva de crecimiento es preciso prestar atención a la distribución de los puntos experimentales a lo largo del tiempo para poder estimar con precisión la velocidad máxima de crecimiento. Para un ajuste adecuado del modelo primario con respecto de los puntos de datos experimentales, es importante disponer de un punto al comienzo de la fase estacionaria y otro posterior en la misma fase (Imagen 3).

En función del *software* utilizado para estimar la velocidad máxima de crecimiento, no se ofrece resultado en la misma unidad. En DMFit, si el dato de entrada es de log₁₀ ufc/g, la V_{máx.} se calcula en log₁₀ ufc/g y debe multiplicarse por 2,3 para obtener la μ_{máx.} correspondiente. En Sym'Previus, el dato de entrada está en log₁₀ ufc/g y la velocidad máxima de crecimiento (μ_{máx.}) se da y se expresa siempre en Ln ufc/g.

Ha de tenerse en cuenta que, si el incremento de la población microbiana que se observa desde la curva de crecimiento es pequeño ($< 1 \log \text{ ufc/g}$), no se podrá determinar la $\mu_{\text{máx.}}$ de manera fiable. En ese caso, se recomendaría trazar otra curva de crecimiento a mayor temperatura para el ajuste o realizar un estudio de potencial de crecimiento.

Si se tienen sospechas de que un producto no favorece el crecimiento de Lm dadas sus características fisicoquímicas, no se podrá estimar de manera fiable una velocidad máxima de crecimiento. Para demostrarlo, deberá realizarse un ensayo para evaluar el potencial de crecimiento.

Por último, es importante evaluar la incertidumbre sobre la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$) reflejada por el error estándar (ee) o el intervalo de confianza (IC) sobre la estimación de la ($\mu_{\text{máx.}}$). Es importante que el error estándar no sobrepase el 20 % de la estimación de la $\mu_{\text{máx.}}$. En caso negativo, si existe una incertidumbre elevada asociada a la $\mu_{\text{máx.}}$, el resultado debe interpretarse con cautela.

6.3.2.9 Aplicación de resultados

Los operadores de empresas alimentarias son responsables del uso de los resultados de los ensayos de desafío.

La velocidad máxima de crecimiento puede utilizarse para evaluar el incremento en la población de Lm durante la vida útil del producto bajo diferentes temperaturas de almacenamiento.

A partir de la cinética de crecimiento del ensayo de desafío que se haya obtenido a una temperatura constante (T°_{CT}), se puede estimar la velocidad de crecimiento a otra temperatura (T°).

La velocidad de crecimiento que se determine por el ajuste de un modelo primario (por ejemplo, DMFit) a la cinética de crecimiento se denomina velocidad de crecimiento $_{CT}$. Puede entonces obtenerse el cálculo de la velocidad de crecimiento en el mismo alimento (mismas características fisicoquímicas) a otra temperatura T° utilizando modelos secundarios.

Se puede utilizar la siguiente ecuación simplificada (Ratkowski et al., 1982) (Mejlholm et al., 2010) del modelo secundario de raíz cuadrada (uno de los modelos secundarios disponibles) (si solo se considera la temperatura en la simulación y si T° y T_{CT} se encuentran por debajo de 25 °C). En esta fórmula no se tiene en cuenta el efecto de las bacterias del ácido láctico en la inhibición del crecimiento de la Lm . Por ende, la fórmula no es adecuada para productos con altos niveles de bacterias del ácido láctico. En este caso debe utilizarse un modelo más completo.

$$\text{growth rate}_{T^{\circ}} = \text{growth rate}_{CT} \cdot \frac{(T^{\circ} - T_{\text{mín}})^2}{(T_{CT} - T_{\text{mín}})^2}$$

donde $T_{\text{mín}}$ es la temperatura de crecimiento mínima de Lm (-2 °C es el valor que se incluye por defecto en la Tabla 1 y puede utilizarse para todas las cepas como valor genérico).

Incremento en *Lm* (en \log_{10}) para un periodo de almacenamiento d_1 (en días) a T_{CT} = velocidad de crecimiento c_T
(\log_{10} ufc/g por día) x d_1

Incremento en *Lm* (en \log_{10}) para un periodo de almacenamiento d_2 (en días) a T° = velocidad de crecimiento c_T°
(\log_{10} ufc/g por día) x d_2

Nota: En este cálculo, la velocidad máxima de crecimiento debe expresarse en \log_{10} (= $V_{m\acute{a}x.}$).

La simulación de crecimiento puede aplicarse a cualquier perfil de tiempo/temperatura y, en particular, a las condiciones a las que sea más probable que se someta el producto en su uso normal hasta el consumo final.

El modelo cardinal es otro de los modelos secundarios que puede utilizarse. En este caso, para predecir de forma más adecuada el crecimiento de una cepa de *Lm* específica inoculada en el producto, se recomienda determinar los valores cardinales ($T_{m\acute{i}n.}$, T_{opt} y $T_{m\acute{a}x.}$) de dicha cepa a partir de la norma ISO/NP 23961, «Microbiología de la cadena alimentaria. Determinación y uso de valores cardinales», e introducir dichos valores en el modelo cardinal. Para ello pueden utilizarse herramientas fáciles de usar (por ejemplo, la simulación de crecimiento del *software* Sym' Previus (www.symprevius.eu)).

Ejemplo 1. Estimación del incremento de la población de *Lm* sin periodo de latencia.

➤ **Datos:**

- Producto con una vida útil de 9 días (el «día 0» es el día de producción);
- Condiciones de almacenamiento: 4 °C para 3 días (d_1) y 8 °C para 6 días (d_2);
- El ensayo de desafío se realizó en el producto a T_{CT} = 8 °C.

La velocidad máxima de crecimiento (con su error estándar) estimado a 8 °C del ajuste es:

Velocidad de crecimiento $c_T = 0,764 \log_{10} \text{ ufc/g} \cdot \text{d}^{-1} \pm 0,0367$ (Imagen 3).

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

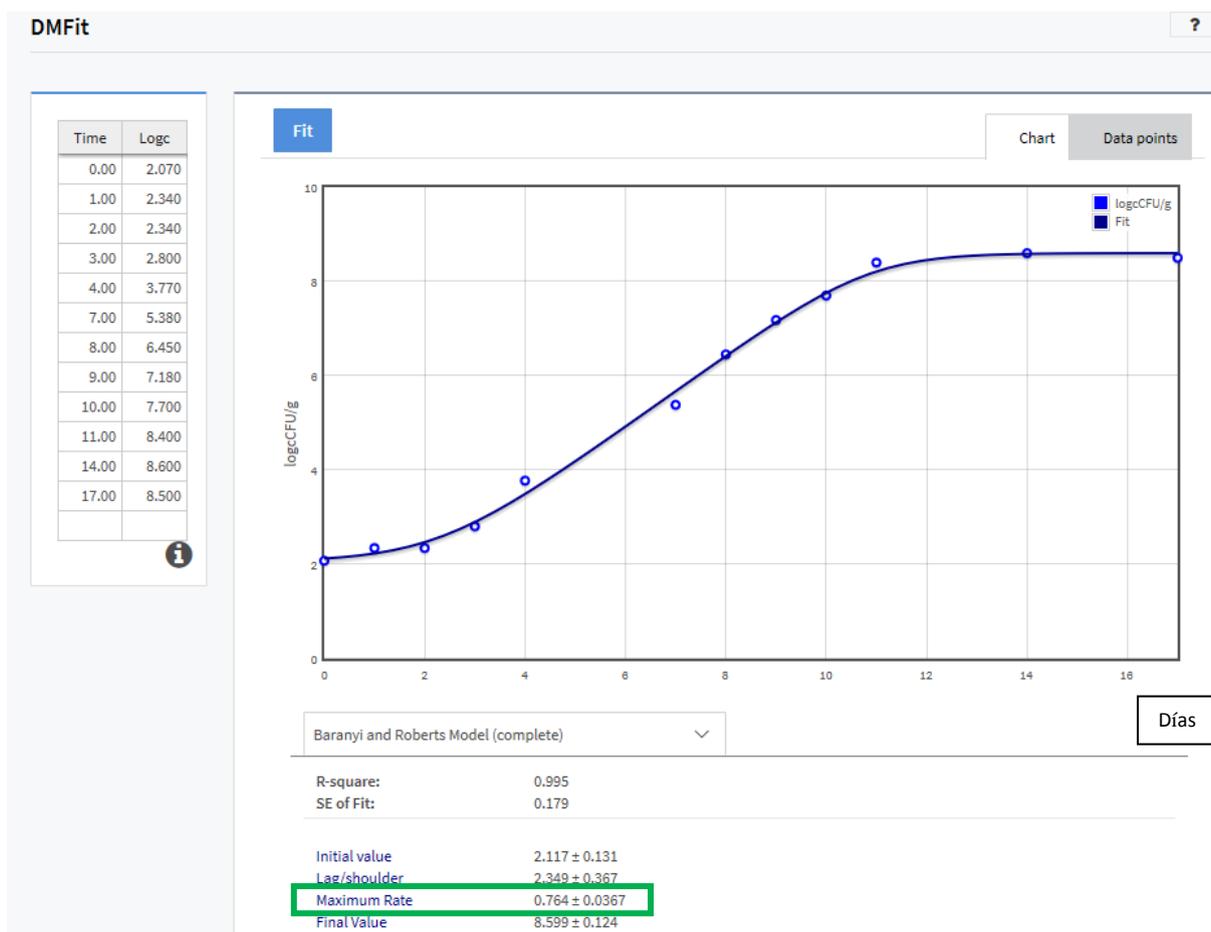


Imagen 3. Ajuste con DMFit del software ComBase (www.combase.cc)

Usar una ecuación simplificada del modelo secundario de raíz cuadrada permite estimar la velocidad de crecimiento a $T^\circ = 4^\circ\text{C}$

$$\text{velocidad de crecimiento } (T^\circ) = \frac{\left(\frac{T^\circ - T_{\text{mín.}}}{T_{\text{CT}} - T_{\text{mín.}}} \right)^2}{\text{velocidad de crecimiento }_{\text{CT}}}$$

La velocidad máxima de crecimiento a 4°C estimada a partir de la ecuación anterior del modelo secundario es: Velocidad de crecimiento $T^\circ (4^\circ\text{C}) = 0,764 \times (4 - (-2))^2 / (8 - (-2))^2 = 0,275 \text{ log}_{10} \text{ ufc/g} \cdot \text{d}^{-1}$

➤ **Pregunta 1:** ¿cuál es el crecimiento estimado de L_m en el producto durante su vida útil?

Crecimiento estimado de L_m durante la vida útil =

$[(\text{velocidad de crecimiento}_1 (4^\circ\text{C}) \text{ en } \text{log}_{10} \text{ ufc/g por día}) \times d_1] + [(\text{velocidad de crecimiento}_2 (8^\circ\text{C}) \text{ en } \text{log}_{10} \text{ ufc/g por día}) \times d_2]$, donde:

Estimación del incremento de crecimiento de L_m durante la vida útil = $(0,275 \times 3) + (0,764 \times 6) = 5,42 \text{ log}_{10}$

En este cálculo simple no se incluye una fase de latencia ni una fase estacionaria (es decir, se asume un crecimiento exponencial a lo largo de la vida útil) y, en consecuencia, representa la hipótesis menos favorable. Para reducir esta desigualdad, puede utilizarse un *software* microbiológico predictivo.

Se debe tener especial cuidado cuando se incluye un periodo de latencia en la estimación de la vida útil debido a la dificultad para evaluar el estado fisiológico de la *Lm* cuando se produce la contaminación del producto. Deberá justificarse/explicarse la elección de incluir una fase de latencia.

Ejemplo 2. Estimación del incremento de la población de *Lm* calculándose un periodo de latencia.

➤ **Datos:**

- Producto con una vida útil de 9 días (el «día 0» es el día de producción);
- Almacenamiento a 4 °C durante 9 días;
- En este producto, el ensayo de desafío se realizó a $T_{CT} = 8$ °C.

A partir del ajuste obtenido a 8 °C, se estimó un periodo de latencia de 2,35 días.

La relación, $\boxed{\text{latencia} \times \text{velocidad de crecimiento} = h_0}$ (Baranyi and Roberts, 1994), se usa para calcular la constante parámetro h_0 , a partir del cual se estimará el periodo de latencia a 4 °C. Según el ajuste a 8 °C, $h_0 = 0,76 \times 2,35 = 1,79$.

La latencia a 4 °C = $1,79/0,275 = 6,5$ días. Esto implica que el crecimiento solo comenzará tras 6,5 días a 4 °C, por lo que no se producirá crecimiento durante los primeros 6,5 días a 4 °C.

A partir de entonces se puede evaluar el crecimiento del resto de los periodos de almacenamiento de (9 - 6,5) 2,5 días a 4 °C.

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

6.3.2.10 Informe de ensayo

Consúltese la EN ISO 20976-1 en relación con todos los puntos que deben incluirse en el informe de ensayo.

Los resultados de los ensayos de desafío se aplican al producto analizado ($\mu_{\text{máx}}$ específica a la cepa utilizada y a las características intrínsecas y extrínsecas específicas del producto estudiado). Sin embargo, también ofrecen datos útiles para recrear los efectos de una variación en dichas características (pH, a_w , conservantes, temperatura) de los productos estudiados.

El aprovechamiento de los datos (cuando los facilite el laboratorio competente en microbiología predictiva) no entra dentro del alcance de este informe de ensayo. Debe formar parte del informe de estudio de vida útil que preparen los operadores de empresas alimentarias.

7 Estudios de durabilidad

7.1 Introducción

Un estudio de durabilidad relativo a la *Lm* es un estudio de laboratorio que tiene por objeto determinar la concentración de *Lm* al final de la vida útil en un producto contaminado de forma natural almacenado en condiciones razonablemente esperables desde la producción hasta el consumo.

El objetivo de los estudios de durabilidad consiste en estimar la proporción de ALC que supere el límite cuantitativo de 100 ufc/g al final de la vida útil tras un periodo de almacenamiento en el que se reflejen las condiciones esperables de distribución, almacenamiento y uso.

Este tipo de estudio no es válido por sí solo para validar la vida útil microbiológica de los ALC en relación con la *Lm*, debido a la baja prevalencia, al bajo nivel de contaminación y a la distribución heterogénea de la contaminación de *Lm* en productos sólidos. En la mayoría de los casos, se obtendrán resultados de muestras no contaminadas con *Lm*, lo que imposibilitará concluir la evolución de la *Lm* en el producto. Combinar los estudios de durabilidad con otro tipo de estudios, como los ensayos de desafío o la microbiología predictiva, contribuye a validar la vida útil de un ALC en relación con la *Lm*.

En el contexto de la *Lm*, los estudios de durabilidad pueden resultar adecuados en los dos casos siguientes:

- a/ para ALC que favorezcan el crecimiento de la *Lm* y que suelen estar contaminados con niveles bajos de *Lm*, para la verificación de la vida útil.
- b/ para ALC en los que un lote se contamine de forma inesperada (accidental) con *Lm*, para evaluar el crecimiento de la *Lm* en los casos de contaminación natural.

7.2 Protocolo de estudio de durabilidad

A la hora de realizar un estudio de durabilidad, han de tenerse en cuenta los pasos siguientes:

- Descripción del ALC que se analizará;
- Muestreo de alimentos;
- Almacenamiento de muestras;
- Análisis microbiológicos;
- Resultados.

7.2.1 Descripción del ALC que se analizará

Véase el apartado 6.1 «Requisitos previos antes de iniciar un ensayo de desafío» en el que se describe la información relevante requerida por el laboratorio.

7.2.2 Muestreo de alimentos

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

- Muestreo aleatorio único (Anexo 10.15):
Este método de muestreo se aplica a ALC que favorezcan el crecimiento de *Lm* y que suelen contaminarse con niveles bajos de *Lm*. El muestreo debe repetirse para los diferentes lotes a lo largo del tiempo (mismo producto, mismo proceso productivo) para obtener datos que puedan recopilarse para mayor fiabilidad del resultado obtenido.
- Muestreo dirigido:
Este método de muestreo se aplica a ALC en los que se detecte la contaminación inesperada (accidental) de un lote con *Lm* antes de que llegue al mercado. En este caso, se recomienda tomar el mayor número de muestras posible del lote contaminado en el momento más cercano posible a la fecha de producción.

7.2.3 Almacenamiento de muestras

Véase el apartado «Condiciones de almacenamiento» en 6.2.2.6 de «Ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento».

7.2.4 Análisis microbiológicos

Se recomienda reducir el límite del método de recuento a 10 ufc/g o a niveles incluso inferiores para tener más posibilidades de obtener un resultado numérico (x ufc/g) y no uno truncado en < 100 ufc/g.

a/ Para ALC que favorezcan el crecimiento de *Lm* y que suelen contaminarse con niveles bajos de *Lm*

Al final de la vida útil, se realizan análisis cuantitativos de todas las unidades almacenadas en condiciones razonablemente previsibles para evaluar si se supera o no el valor de 100 *Lm*/g o ml al final de la vida útil.

b/ Para ALC en los que el lote se contamine de manera inesperada (accidental) con *Lm*

Al menos, se realizan análisis al principio (lo más cercano posible a la fecha de producción) y al final de la vida útil. Cuando resulte factible, se recomienda llevar a cabo análisis en fechas intermedias para recopilar información sobre el comportamiento de la *Lm*.

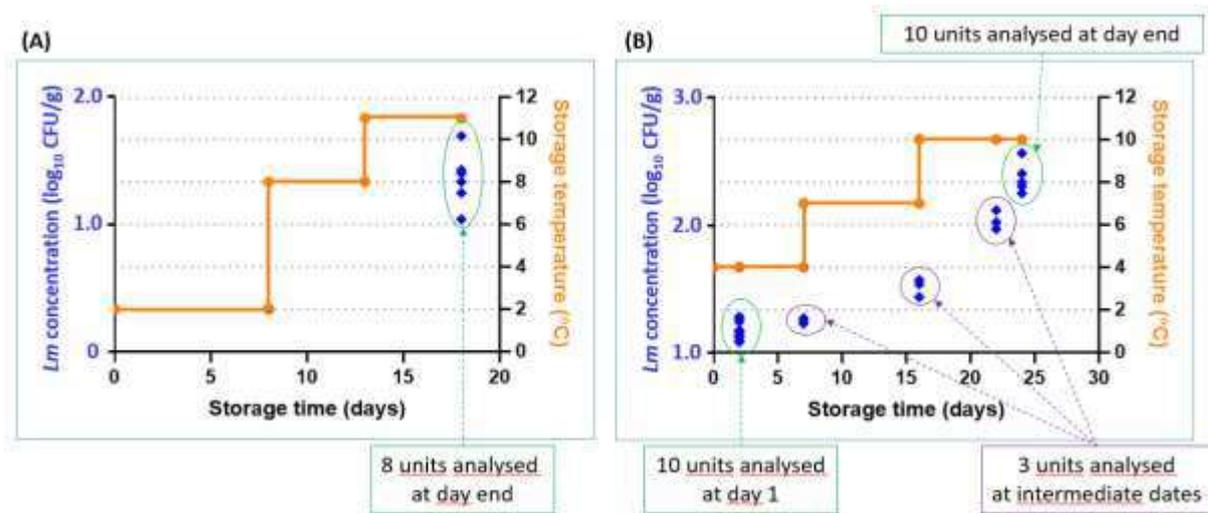


Imagen 4. Ejemplos de estudios de durabilidad en el caso de un lote contaminado con frecuencia con bajos niveles de *Lm* (A) o un lote contaminado de forma inesperada con *Lm* (B)

En la Imagen 4-A, todas las unidades se analizan al final del día para obtener información más precisa sobre la proporción de unidades que puedan superar los 100 ufc/g al final de la vida útil. En la Imagen 4-B, se analizaron diez muestras el día 2, en cuanto se detectó la contaminación inesperada del lote con *Lm* con un nivel de contaminación cercano a log₁₀ ufc/g (10 ufc/g). A continuación, se analizaron 2 muestras a diferentes temperaturas de almacenamiento (reflejando las condiciones razonablemente previsibles de almacenamiento del producto) También se hizo un recuento de la *Lm* el día 24 (final de la vida útil). El incremento en la población de *Lm* en este producto contaminado de forma natural se sitúa alrededor de 1,3 log₁₀ ufc/g.

7.2.5 Resultados

En lo que respecta a los ALC que pueden favorecer el crecimiento de *Lm* y que suelen contaminarse con niveles bajos de *Lm*, esta interpretación puede facilitarse evaluando la proporción estimada de unidades que excedan 100 ufc/g al final de la vida útil, tras un periodo de almacenamiento en el que se reflejen las condiciones previsibles de distribución y almacenamiento, como se describe a continuación.

Del número (n) de unidades tomadas de forma aleatoria de un lote (de tamaño N), la proporción observada (p) de unidades que superan el nivel de 100 ufc/g al final de la vida útil es:

$$p = r / n \text{ (donde } r \text{ es el número de unidades de ensayo que superan 100 ufc/g).}$$

Para estimar con un intervalo de confianza (IC) del 95 % la proporción de unidades que superan 100 ufc/g en toda la población del lote, puede utilizarse la siguiente calculadora: http://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html.

Esta calculadora ofrece dos métodos de cálculo: el intervalo central de confianza y el intervalo de confianza más corto. Los intervalos de confianza (IC) dados para cada método pueden variar ligeramente, pero se encuentran en el mismo orden de magnitud. Se recomienda utilizar el general, el intervalo central de confianza.

En la Tabla 7 se enfatiza la importancia real de obtener del lote un número de unidades suficiente o de recopilar resultados que se hayan obtenido con anterioridad para una mejor estimación de la proporción de unidades por encima de 100 ufc/g.

Por ejemplo, cuando se analizan 10 unidades y ninguna de ellas tiene una concentración de *Lm* > 100 ufc/g, la proporción estimada de unidades > 100 ufc/g del total de la población puede alcanzar el 28 % (valor IC superior). Esta proporción estimada es del 13 % (valor IC superior) cuando se analizan 50 unidades y 2 unidades superan 100 ufc/g. En estos ejemplos se realiza la importancia de notificar el valor del intervalo de confianza superior.

Tabla 7. Ejemplo de proporción estimada de unidades > 100 Lm/g en el lote completo con respecto del número de unidades analizadas

<i>n</i> número de unidades analizadas	<i>r</i> número de unidades > 100 ufc/g	<i>p</i> proporción observada de unidades > 100 ufc/g	Proporción estimada (con IC de 95 %) de unidades > 100 ufc/g en todo el lote
5	0	0%	[0% - 46%]
10		0%	[0% - 28%]
20		0%	[0% - 16%]
50		0%	[0% - 7%]
100		0%	[0% - 4%]
5		1	20%
10	10%		[2% - 41%]
20	5%		[1% - 24%]
30	3%		[0,7% - 16%]
50	2%		[0,4% - 10%]
100	1%		[0,2% - 5%]
5	2	40%	[12% - 78%]
10		20%	[6% - 52%]
20		10%	[3% - 30%]
30		7%	[2% - 21%]
50		4%	[1% - 13%]
100		2%	[0,6% - 7%]

Cuanto mayor sea el número de unidades analizadas, más estrecho será el intervalo de confianza. Para obtener un número amplio de unidades analizadas, se pueden recopilar resultados de ensayos repetidos que se hayan realizado en un ALC obtenido del mismo producto y proceso.

Nota: en los análisis de lotes (control oficial), uno de los criterios que se definen en el Reglamento (CE) N.º 2073/2005 para ALC en la categoría 1.2. (favorece el crecimiento de *Lm*), es «n=5, c=0, m=M=100 ufc/g» en el momento de consumo. Cuando se excede el límite de este criterio, se considera que el producto no es seguro y no puede introducirse en el mercado. En consecuencia, es preciso revisar y mejorar el proceso productivo y reformular o reducir la vida útil. No obstante, dichos controles de conformidad de lotes no entran dentro del alcance del presente documento.

7.2.6 Informe de estudio

En el informe de estudio se deberá incluir toda la información relativa a los cinco pasos de un estudio de durabilidad:

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

8 Referencias

Afnor NF V45-008 Processed fish - Filtration method for low enumeration level (smoked salmon, smoked trout).

Hoja de datos de Anses sobre peligros biológicos de los alimentos «*Listeria monocytogenes*», abril de 2020.
<https://www.anses.fr/en/system/files/BIORISK2016SA0081FiEN.pdf>.

Augustin, J. C., V. Zuliani, *et al.* (2005). Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *J Appl Microbiol* 99(5): 1019-42

Baranyi y Roberts (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23:277-294.

Códex Alimentarius. Directrices generales sobre muestreo (CAC/GL 50 -2004).

Comisión del Códex Alimentarius. Directrices para la validación de medidas de control de la inocuidad de los alimentos (CAC/GL 69-2008).

Reglamento (CE) nº 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, modificado por el Reglamento de la Comisión (UE) 2019/229.

Dalgaard, P. y Jorgensen, L. V. (1998). Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 40 (1-2): 105-115.

DMFit del *software* ComBase. www.combase.cc.

EFSA 2007b. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on microbiological criteria and targets based on risk analysis. *Diario EFSA* 462: 1-29.
<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/462>

Documento de orientación técnica para evaluar la vida útil de alimentos listos para el consumo en relación con la *Listeria monocytogenes* del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la *Listeria monocytogenes* (EURL Lm), versión 3 de 6 de junio de 2014. Modificación 1 de febrero de 2019.

Félix et al., (2018) Population Genetic Structure of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From the Pig and Pork Production Chain in France. *Front Microbiol* 6;9:684.

Software de predicción de la seguridad y el deterioro de los alimentos. <http://fssp.food.dtu.dk/>.

Food Safety Authority of Ireland - Guidance note No 18. Validation of product shelf-life (revision 4)
https://www.fsai.ie/publications_GN18_shelf-life/.

Gillesberg Lassen et al., (2016) Two *Listeria* outbreaks caused by smoked fish consumption - using whole-genome sequencing for outbreak investigations. *Clin Microbiol Infect.* 22(7):620-4.

Giménez B., Dalgaard P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in cold smoked salmon. *J Appl Microbiol* 96(1):96-109.

Documento CE/DG SANCO de orientación sobre los estudios de vida útil de *Listeria monocytogenes* para alimentos listos para consumo, según el Reglamento (CE) n°. 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios

https://ec.europa.eu/food/system/files/2016-10/biosafety_fh_mc_guidance_document_lysteria.pdf

ISO 7218, Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.

ISO 11290-1 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* Parte 1: Método de detección.

ISO 11290-2 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* Parte 2: Método de recuento.

ISO 16140-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Método de validación. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia.

ISO 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Maury et al., (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet.* 48(3):308-313.

McKellar, R.C. (2001). Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells. *J Applied Microbiol*, 90, 407- 413.

Mejlholm et al., (2010) Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes*-An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 141 (2010) 137-150.

Ratkowski et al., (1982), Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol.* 149(1):1-5.

Reglamento (UE) N.º 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.

Resnik SL, Chirife J. (1988). Proposed Theoretical Water Activity Values at Various Temperatures for Selected Solutions to be Used as Reference Sources in the Range of Microbial Growth. *J Food Prot*, 51(5):419-423.

Software Sym'Previus: <https://symprevius.eu/software/>

9 Definiciones

Cadena de frío: sistema continuo que facilita almacenamiento refrigerado en alimentos perecederos, desde la producción hasta el consumo.

Unidades de control: unidad alimenticia idéntica a las unidades de ensayo, pero que no esté contaminada de forma artificial (servirá de testigo).

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

Higrometría: medición de la humedad en aire y gas.

Percentil: el percentil x^o de un conjunto de valores que divide estos valores de manera que el x % de los valores se encuentra por debajo y el $(100-x)$ % de los valores se encuentra por encima. Ejemplos: El 90 % de los valores se sitúan en el percentil noventa o por debajo de él y el 10 %, por encima. La mediana de los valores corresponde al percentil 50, es decir, el 50 % de los valores están por debajo de la mediana y el 50 %, por encima.

pH: medición de la concentración de la acidez o alcalinidad en una solución acuosa. El pH 7 se considera neutro. Los valores de pH inferiores a siete se consideran ácidos y los superiores a siete, básicos (alcalinos).

Alimentos listos para el consumo (ALC): alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos.

Vida útil: periodo de tiempo en el que un producto permanece inocuo y cumple las especificaciones de calidad en condiciones razonablemente previsibles de almacenamiento, distribución y uso.

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

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

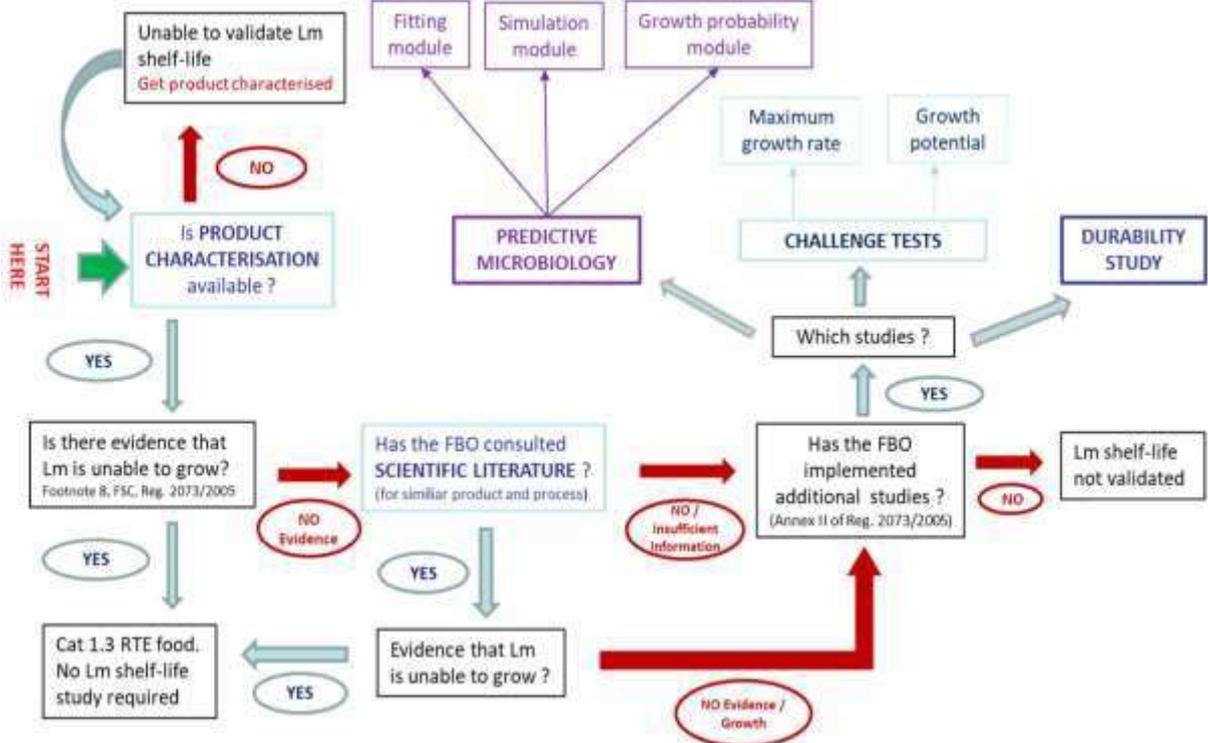
Contenido de sal en la fase acuosa (WPS): porcentaje de sal en la fase acuosa de un producto.

10 Anexos

10.1 Tabla en la que se muestran los beneficios/limitaciones de los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento, la velocidad máxima de crecimiento y de los estudios de durabilidad.

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

10.2 Diagrama de flujo para establecer y comprobar la vida útil de los alimentos listos para consumo con respecto a la *Listeria monocytogenes*



10.3 Listado de parámetros característicos del producto que repercuten en el crecimiento de la *Lm*

Intrinsic factors

- pH
- a_w (water activity)* or salt/sugar and moisture contents
- Organic acids, Nitrite
- Preservative content
- Background microflora
- Structure of the food

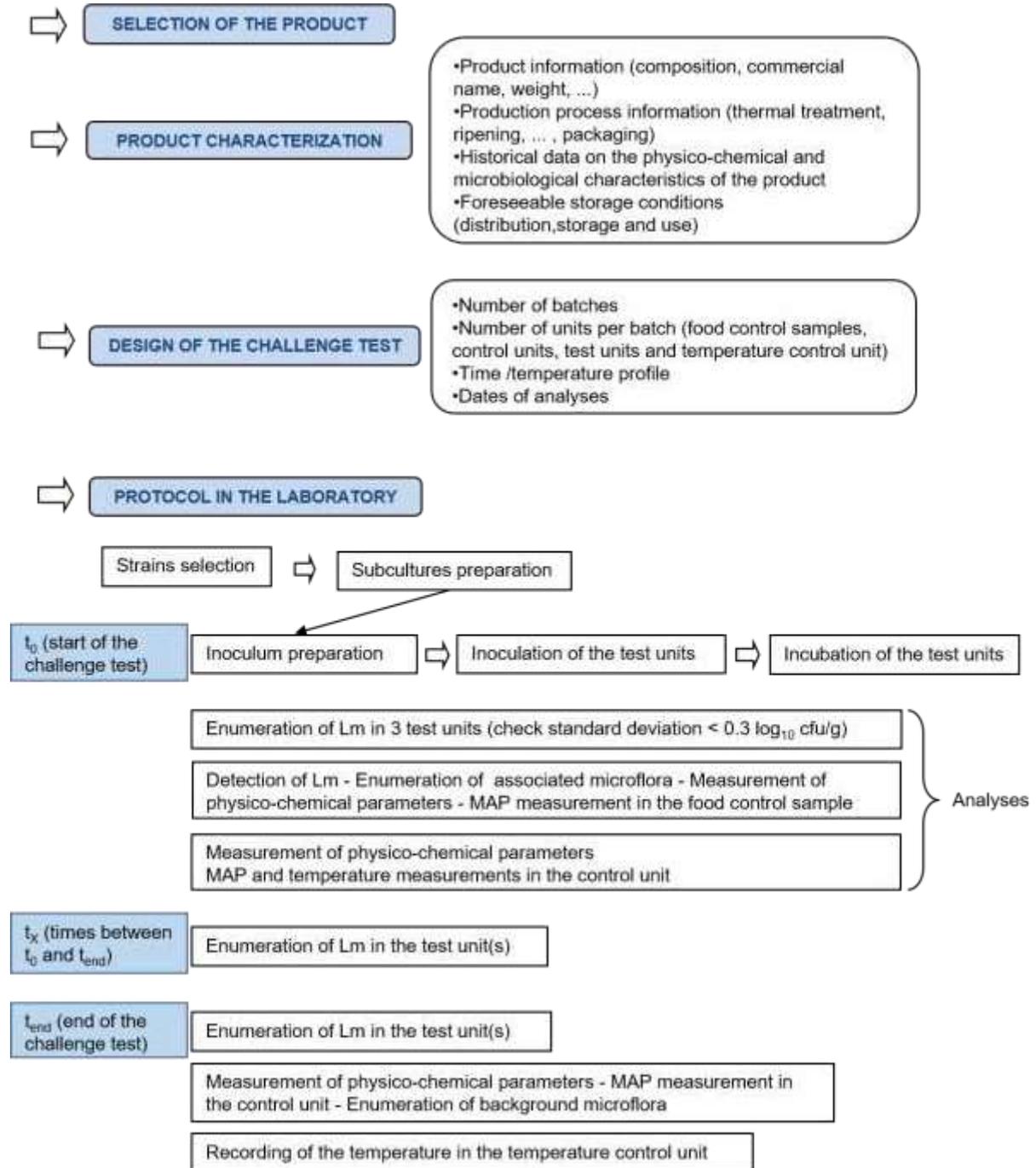
*) a_w (water activity) of a food

- defined as the ratio: vapor pressure of water in a food (p)/vapor pressure of pure water (p₀) at the same temperature
- represents the amount of free water in the food, available to support the growth of bacteria

Extrinsic factors

- Temperature of cold chain
 - From manufacturer
 - To intermediate storage, transport, retail and consumer
- Relative air humidity
(throughout storage for unpacked products)
- Packaging conditions of the end product
(air packed, vacuum, MAP, gas permeability of the packaging material)
- Gas composition
(for products under MAP)

10.4 Diagrama de flujo en el que se describen los pasos esquemáticos del histórico de datos de operadores de empresas alimentarias para las pruebas de laboratorio



10.5 Conjunto de cepas de *L. monocytogenes* y sus características de crecimiento

El conjunto de cepas del EURL *Lm* se clasificó atendiendo a sus velocidades de crecimiento en relación con los orígenes, condiciones de temperatura, pH y a_w y genoserotipos. En el sitio web <https://eurl-listeria.anses.fr/> se incluye información adicional en el informe dedicado al conjunto de cepas para ensayos de desafío.

Tabla 8. Elección de cepas en función de la capacidad de crecimiento en relación con los orígenes, condiciones y genoserotipos

Origen	Productos cárnicos		
Genoserotipo	a_w baja ($a_w = 0,95$)	pH bajo (pH = 5)	Baja temperatura (T = 8 °C)
II	12MOB045LM 12MOB046LM	12MOB045LM 12MOB046LM	12MOB045LM 12MOB046LM
IV	12MOB085LM 12MOB089LM	12MOB112LM 12MOB089LM	12MOB085LM 12MOB089LM
Origen	Productos de pescado		
Genoserotipo	a_w baja ($a_w = 0,95$)	pH bajo (pH = 5)	Baja temperatura (T = 8 °C)
II	12MOB101LM 12MOB100LM	12MOB101LM 12MOB100LM	12MOB099LM 12MOB101LM
IV	12MOB103LM 12MOB102LM	12MOB103LM 12MOB102LM	12MOB102LM 12MOB107LM
Origen	Productos lácteos		
Genoserotipo	a_w baja ($a_w = 0,95$)	pH bajo (pH = 5)	Baja temperatura (T = 8 °C)
II	12MOB098LM 12MOB118LM	12MOB118LM 12MOB098LM	12MOB098LM 12MOB079LM
IV	12MOB096LM 12MOB106LM	12MOB097LM 12MOB096LM	12MOB096LM 12MOB105LM
Origen	Otros productos		
Genoserotipo	a_w baja ($a_w = 0,95$)	pH bajo (pH = 5)	Baja temperatura (T = 8 °C)
II	12MOB048LM 12MOB047LM	12MOB051LM 12MOB047LM	12MOB049LM 12MOB047LM/ 12MOB051LM
IV	12MOB050LM 12MOB052LM	12MOB050LM 12MOB052LM	12MOB052LM 12MOB050LM

Modo de uso de la tabla

Ejemplo 1: si el producto que se analizará proviene de productos lácteos, es más bien ácido ($pH \leq 5$), entonces la cepa elegida podría ser 12MOB118LM o 12MOB098LM o 12MOB097LM o 12MOB096LM.

Ejemplo 2: si el producto que se analizará proviene de productos cárnicos, no es ni ácido ($pH > 5$), ni con una a_w baja ($a_w > 0,95$), entonces la cepa elegida podría ser 12MOB045LM o 12MOB046LM o 12MOB085LM o 12MOB089LM.

10.6 Ejemplo de preparación del inóculo para los ensayos de desafío

A. Preparación de subcultivos para la cepa 1

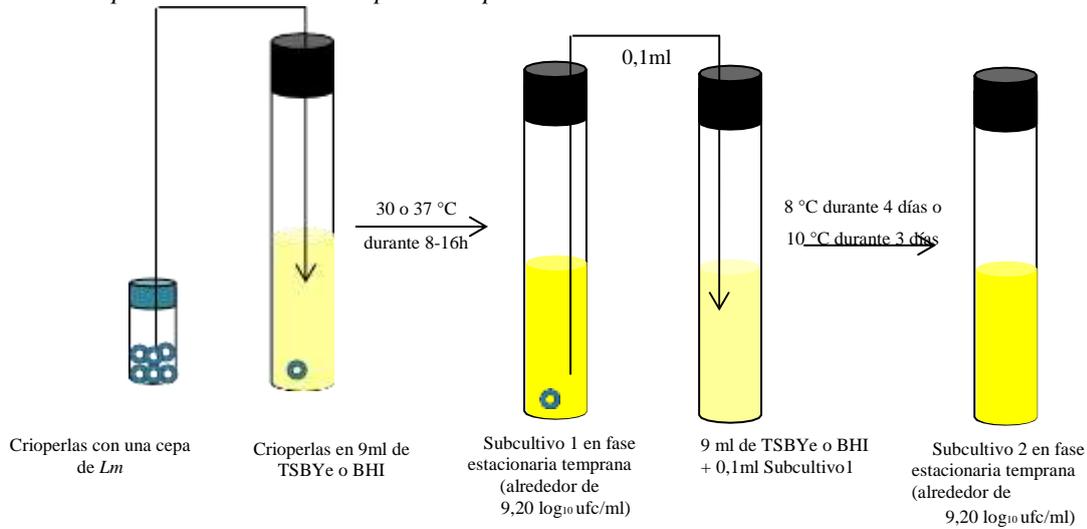


Imagen 5: Preparación de los 2 subcultivos para cada cepa

El proceso se repite para la cepa 2 y otras cepas, si se usan. Los valores dados se refieren a las cepas del EURL *Lm*.

B. Preparación del inóculo para los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento

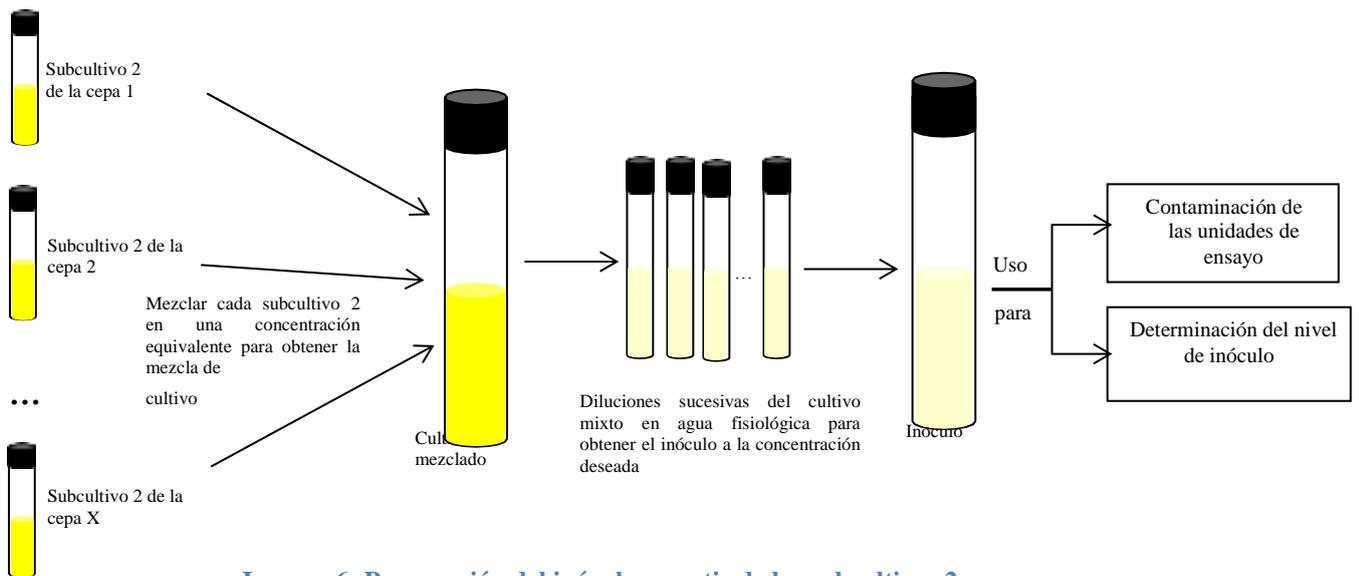


Imagen 6: Preparación del inóculo a partir de los subcultivos 2

C. Preparación del inóculo para los ensayos de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento

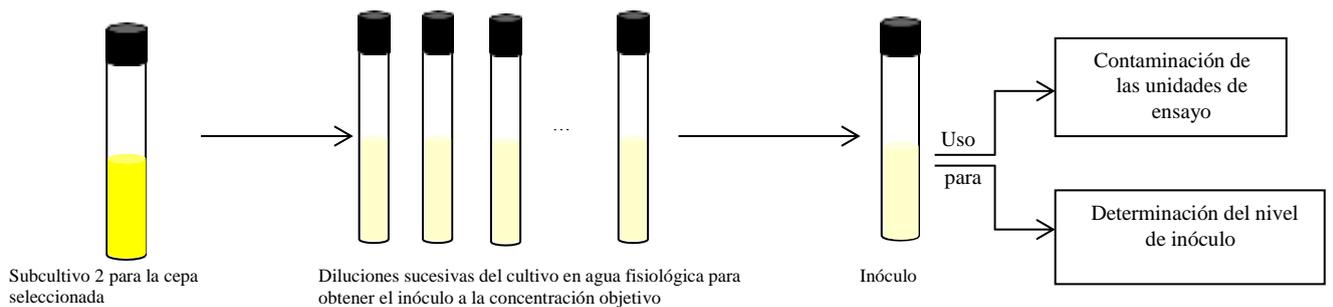


Imagen 7: Preparación del inóculo a partir de los subcultivos 2 en una cepa única

D. Método para obtener la concentración objetivo de inóculo con un ejemplo numérico

El cultivo mezclado para ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento tiene una concentración estimada de $9,2 \log_{10}$ ufc/ml, lo que equivale a $1.58.10^9$ ufc/ml.

La concentración objetivo de toda la matriz es de 100 ufc/g.

La masa de toda la matriz es de 650 g. El volumen del inóculo que se introducirá en la matriz alimentaria no deberá exceder el 1 % de la masa de toda la matriz; el volumen máximo del inóculo es 6,5 ml. Es necesario diluir cuatro veces por diluciones decimales el cultivo mixto para acercarse a la concentración requerida del inóculo en toda la matriz: $C_{\text{cultivo mezclado diluido}} = 1.58.10^5$ ufc/ml.

Es necesario preparar una cantidad adecuada de inóculo para poder contaminar toda la matriz. Por ejemplo, 10 ml, de forma que la concentración del inóculo sea $1.58.10^4$ ufc/ml.

El siguiente paso consiste en determinar el volumen necesario del inóculo para contaminar los 650 g de la matriz.

Se sabe que:

$$C_{\text{inóculo}} \times V_{\text{inóculo}} = C_{\text{matriz completa}} \times M_{\text{matriz}}$$

$$V_{\text{inóculo}} = (C_{\text{matriz completa}} \times M_{\text{matriz}}) / C_{\text{inóculo}}$$

$$V_{\text{inóculo}} = (100 \text{ ufc/g} \times 650 \text{ g}) / 1.58.10^4$$

$$V_{\text{inóculo}} = 4,1 \text{ ml}$$

En resumen:

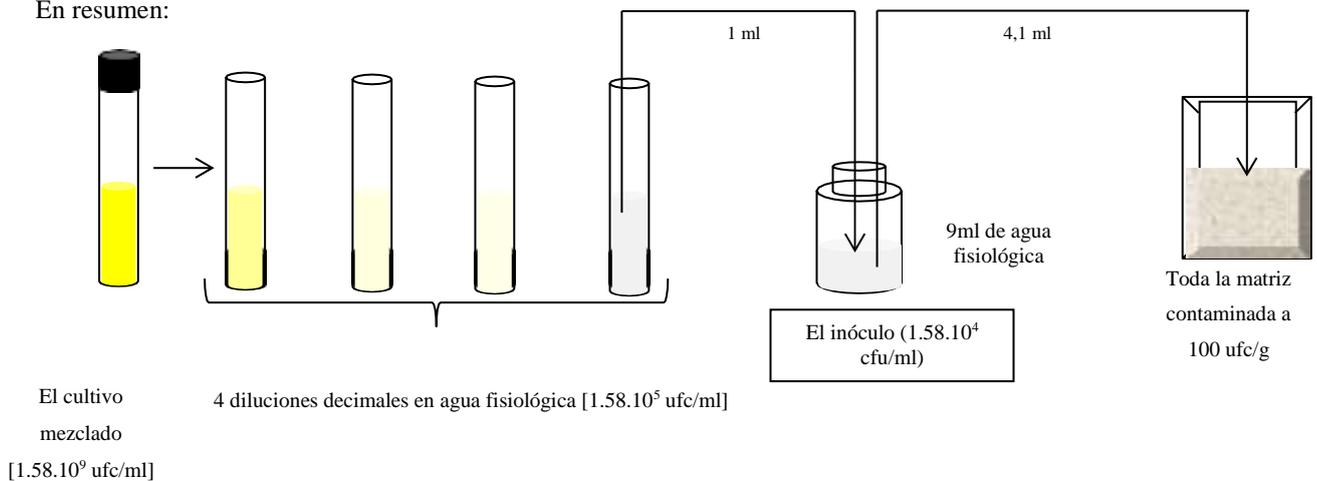


Imagen 8: A partir del cultivo mezclado a la inoculación de la matriz completa

El método para obtener la concentración objetivo del inóculo es la misma para el ensayo de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento, a excepción del punto inicial, que no es una mezcla de cultivo de cepas, sino el segundo subcultivo de una cepa.

10.7 Ejemplos de técnicas de contaminación

Las unidades de ensayo pueden contaminarse en profundidad o en la superficie.

En este párrafo se incluyen ejemplos de técnicas de matriz e inoculación:

- En profundidad: un producto semilíquido en una pequeña cantidad (20 g) en una bolsa estéril
por ejemplo, 20 g de crema contaminada por un volumen pipeteado



- En profundidad: un producto semilíquido en una gran cantidad (≈ 500 g) con un mezclador y dividido en x muestras de x g
por ejemplo, una gran cantidad de crema contaminada por un volumen pipeteado



- En la superficie: un producto troceado
por ejemplo, una loncha de salmón ahumado contaminada con 5 manchas de $20 \mu\text{l}$ en la mitad de la superficie de la placa y luego se dobla la placa. Se utiliza un esparcidor para mejorar la distribución del inóculo.



- En la superficie: un producto sólido de trozos pequeños

Por ejemplo, jamón desmenuzado contaminado en la superficie de los trozos con una jeringuilla graduada a través de un septo. Este septo se recupera de inmediato con un segundo septo para no romper la atmósfera del envase y mantener las condiciones exactas del gas.

Nota: Es posible dividir el inóculo en 2 partes y enviarlo a través de 2 septos. El inóculo puede dividirse en más partes y enviarse a través de más septos. Después de la inoculación, las unidades de prueba se agitan para distribuir el inóculo de manera homogénea.

DOBLE
SEPTO



10.8 Ejemplos del número total de unidades necesarias para un ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento

Tabla 9. Ejemplo 1: Productos envasados al aire o al vacío. 3 lotes analizados

Tipo de unidades	Tipo de análisis	Nº de unidades y fecha de análisis por lote	
Unidades de ensayo	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	7	3 unidades de ensayo en t_0 y 1 unidad de ensayo en 3 fechas intermedias y 1 en t_{final}
Muestras de control alimentario	Detección de <i>L. monocytogenes</i>	1	1 en t_0
	Medición de características fisicoquímicas		
	Recuento de la microbiota asociada		
Unidades de control	Medición de características fisicoquímicas	2	1 en t_0 y 1 en t_{final}
	Recuento de la microbiota asociada		
	Control de temperatura	1	durante todo el ensayo
Número total de unidades		11 *	

Número total necesario para 3 lotes	33 *
--	-------------

(*) En función de la cantidad de producto en las unidades, es posible que el número total para disponer de cantidad suficiente de producto para realizar todos los análisis necesarios.

Tabla 10. Ejemplo 2: Productos EAM: 3 lotes analizados

Tipo de unidades	Tipo de análisis	Nº de unidades y fecha de análisis por lote	
Unidades de ensayo	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	7	3 unidades de ensayo en t_0 3 intermedarios y 1 en t_{final}
Muestras de control alimentario	Detección de <i>L. monocytogenes</i>	2	1 en t_0
	Medición de características fisicoquímicas		1 en t_0
	Recuento de la microbiota asociada		1 en t_0
	Medición EAM		1 en t_0 y 1 en t_{final}
Unidades de control	Medición de características fisicoquímicas	2	1 en t_0 y 1 en t_{final}
	Recuento de la microbiota asociada		
	Medición EAM		
	Control de temperatura	1	durante todo el ensayo
Número total necesario por lote		12*	

Número total necesario para 3 lotes	36*
--	------------

(*) En función de la cantidad de producto en las unidades, es posible que el número total para disponer de cantidad suficiente de producto para realizar todos los análisis necesarios.

Tabla 11. Ejemplo 3: Productos envasados al aire o al vacío. 3 lotes analizados. Mediciones de parámetros fisicoquímicos externalizados

Tipo de unidades	Tipo de análisis	Número de unidades y fecha de análisis por lote	
Unidades de ensayo	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	7	3 unidades de ensayo en t_0 3 intermediarios y 1 en t_{final}
Muestras de control alimentario	Detección de <i>L. monocytogenes</i>	1	1 en t_0
	Recuento de la microbiota asociada		1 en t_0
	Medición de las características fisicoquímico	2 (externalizado)	1 en t_0 y 1 en t_{final}
Unidades de control	Recuento de la microbiota asociada	2	1 en t_0 y 1 en t_{final}
	Medición de las características fisicoquímico	2 (externalizado)	
	Control de temperatura	1	durante todo el ensayo
Número total necesario por lote		15*	
Número total necesario para 3 lotes		45*	

(*) En función de la cantidad de producto en unidades, es posible que sea preciso incrementar el número total para disponer de cantidad suficiente de producto para relajar todos los análisis necesarios.

Tabla 12. Ejemplo 4: Productos envasados al aire o al vacío. 3 lotes analizados. 3 unidades de ensayo analizadas por puntos de muestreo

Tipo de unidades	Tipo de análisis	Número de unidades y fecha de análisis por lote	
Unidades de ensayo	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	15	3 unidades de ensayo por cada uno de los 5 puntos de muestreo
Muestras de control alimentario	Detección de <i>L. monocytogenes</i>	3	1 en t_0
	Medición de las características fisicoquímico		3 en t_0
	Recuento de la microbiota asociada		3 en t_0
Unidades de control	Medición de las características fisicoquímico	3	3 en t_0 y t_{final}
	Recuento de la microbiota asociada		
	Control de temperatura	1	durante todo el ensayo
Número total necesario por lote		22*	
Número total necesario para 3 lotes		66*	

(*) En función de la cantidad de producto en unidades, es posible que sea preciso incrementar el número total para disponer de cantidad suficiente de producto para relajar todos los análisis necesarios.

10.9 Ejemplo de la repercusión de la temperatura de almacenamiento en la vida útil

La temperatura durante la vida útil es una parte esencial en los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento. A continuación, se incluye un ejemplo de un producto cárnico almacenado a diferentes temperaturas:

- Escenario N.º 1: a temperatura constante de 4 °C;
- Escenario N.º 2: incluye 3 pasos (un tercio de la vida útil para cada paso), (i) 4 °C para recrear el almacenamiento/transporte desde la planta hasta la venta al por menor, (ii) 7 °C para recrear el almacenamiento en la venta al por menor y (iii) 10 °C para recrear el almacenamiento por el consumidor;
- Escenario N.º 3: incluye 3 pasos (un tercio de la vida útil para cada paso), (i) 7 °C para recrear el almacenamiento/transporte desde la planta hasta la venta al por menor, (ii) 7 °C para recrear el almacenamiento en la venta al por menor y (iii) 10 °C para recrear el almacenamiento por el consumidor;

Vida útil del producto: 30 días.

Características fisicoquímicas del producto:

- pH = 6,1 y
- aw = 0,978.

Envasado del producto: 50 % CO₂/ 50 % N₂.

Parte contaminada: 100g.

Nivel de contaminación inicial medio de *Listeria monocytogenes* en este producto: -2 log₁₀ ufc/g. Se estima la vida útil del producto para cada escenario (Imagen 9).

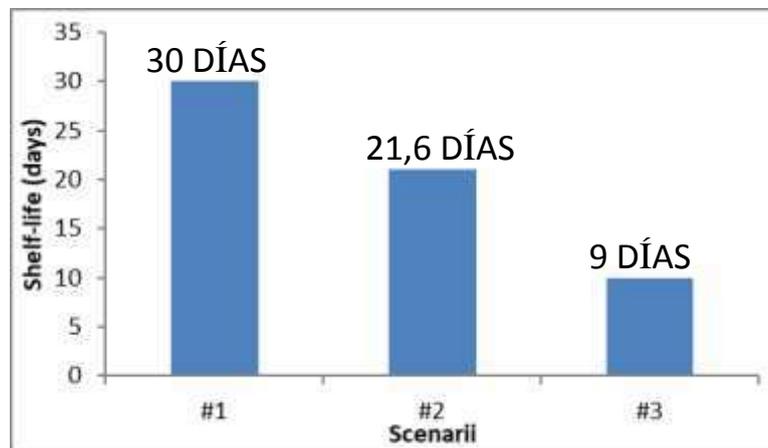


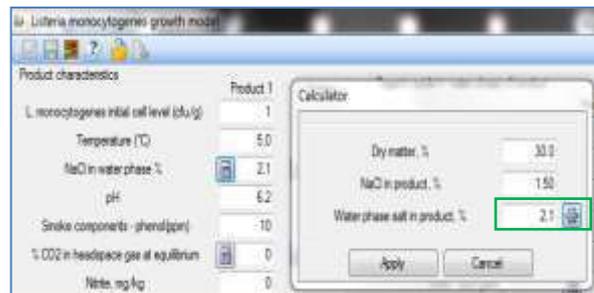
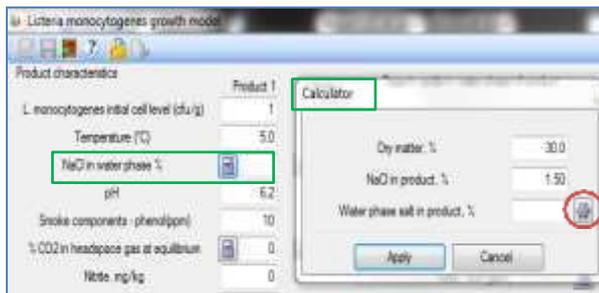
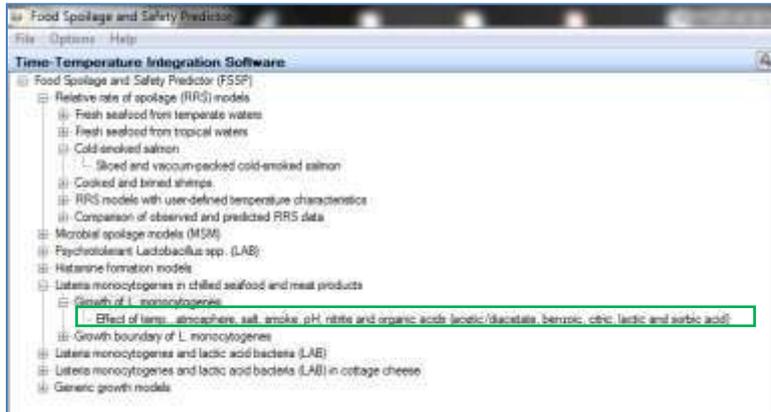
Imagen 9: Vida útil de un producto cárnico en relación con los diferentes escenarios

En el escenario N.º 1, la vida útil del producto es de 30 días. En los escenarios N.º 2 y 3 es 1,4 y 3 veces inferior, respectivamente.

10.10 Uso de la calculadora FSSP para el cálculo WPS y a_w

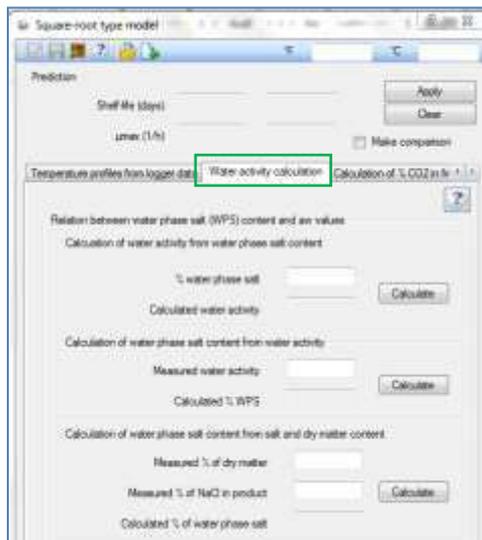
a - Cálculo WPS

En el menú FSSP, seleccionar “*Listeria monocytogenes* en productos cárnicos y mariscos refrigerados”, luego “Crecimiento de *L.monocytogenes*” y “Efecto de la temperatura, la atmósfera, la sal”



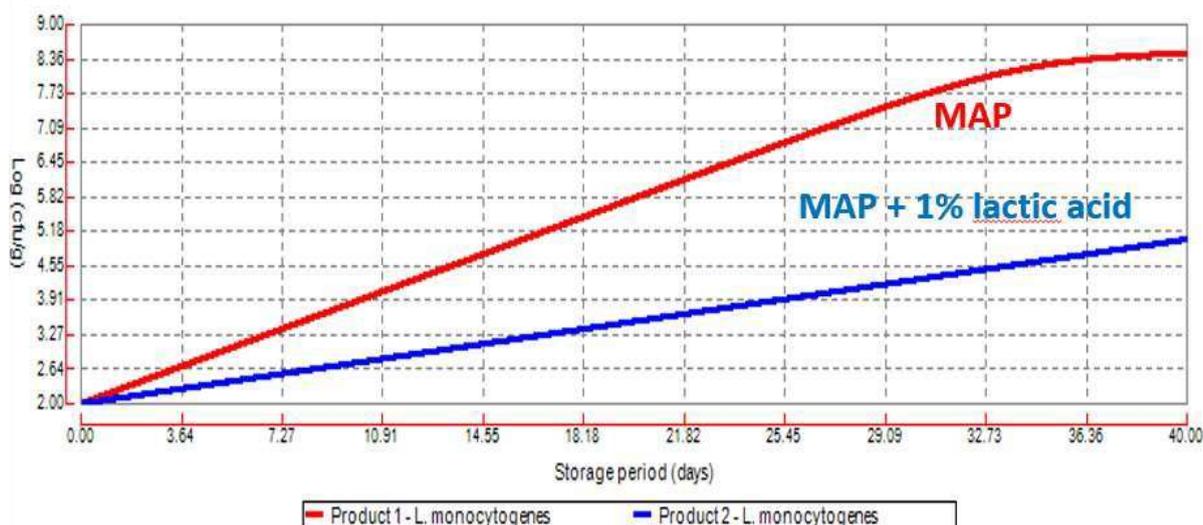
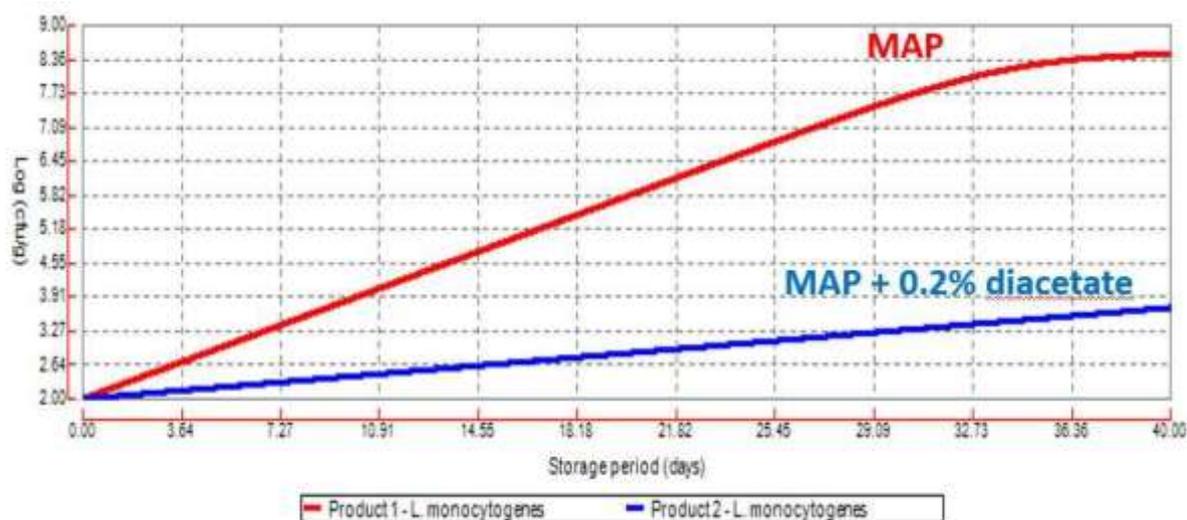
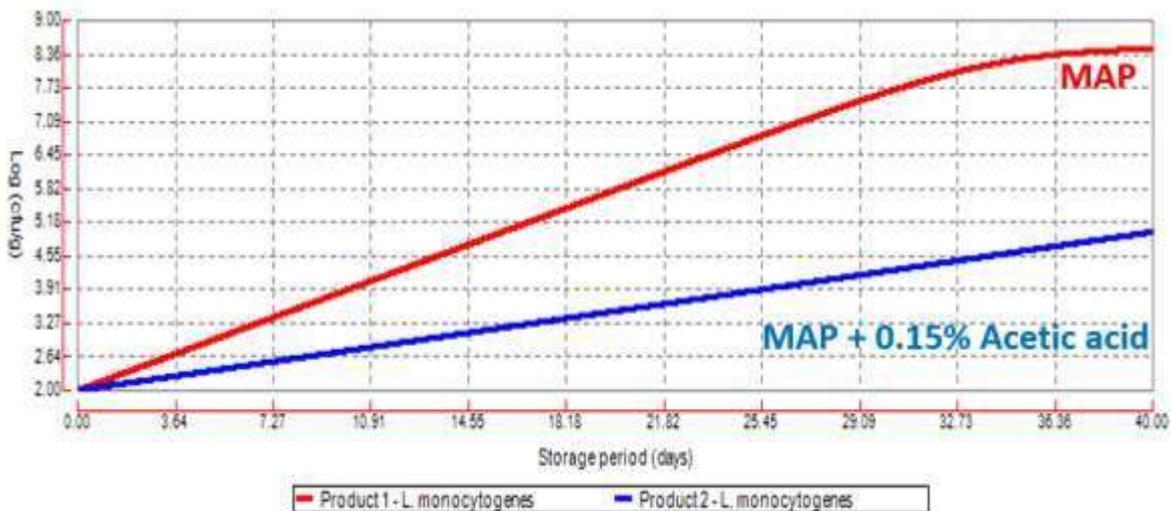
b - Cálculo a_w

En el menú FSSP, seleccionar “Modelos de deterioro microbiano (MSM)”, luego “Modelos MS con valores de parámetros definidos por el usuario” y “Modelo de tipo raíz cuadrada”



10.11 Ejemplos de uso de ácidos orgánicos como conservantes alimentarios

Simulaciones de crecimiento de *Lm* con el *software* de predicción de la seguridad y el deterioro de los alimentos (FSSP) en productos alimentarios en condición EAM con o sin ácidos orgánicos.



10.12 Medición de la atmósfera de gas para comprobar la estanqueidad del envase

Ejemplo:

- La concentración de la mezcla de gas utilizada es de 70 % N₂ y 30 % CO₂.
- La concentración de la mezcla de gas utilizada en el envasado de las muestras de control alimentario en t_0 , al final y en la unidad de control en t_{final} del ensayo de desafío.

Tabla 13. Ejemplo de medición de mezcla gaseosa

Control	Tiempo de análisis	lote 1	lote 2	lote 3
Muestra de control alimentario (sin septo)	t_0	0,8% O ₂	0,6% O ₂	0,6% O ₂
		7,9 % CO ₂	7,5% CO ₂	7,9% CO ₂
Unidad de control (con septo)	t_{final}	0% O ₂	0% O ₂	0% O ₂
		16,7 % CO ₂	22,6% CO ₂	13,8% CO ₂
Muestra de control alimentario (sin septo)	t_{final}	0% O ₂	0% O ₂	0% O ₂
		22,9% CO ₂	35,0% CO ₂	13,0 % CO ₂

En t_{final} , la comparación de la concentración de O₂ en una unidad de control (con septo) y en una muestra de control alimentario (sin septo) indica una buena estanqueidad del envase durante el periodo de análisis (concentración igual a cero en todo el envase). La concentración de CO₂ en estos controles (unidad de control y muestra de control alimentario) puede resultar útil para la interpretación del crecimiento de *Lm*. En el caso de que también pueda controlarse el CO₂ en las unidades de ensayo, también podrían ser datos útiles para identificar la presencia de valores atípicos (en caso de que exista una amplia diferencia en el crecimiento de la *Lm* entre unidades).

10.13 Ejemplo de preparación de la suspensión inicial

La cantidad total de la unidad de prueba debe analizarse después de la inoculación artificial.

En caso de una gran cantidad de la unidad de prueba, la suspensión inicial puede prepararse:

- dividiendo las unidades de ensayo en porciones y analizando todas las porciones, o
- analizando toda la porción y preparando la suspensión inicial en 2 pasos: realizando 2 diluciones sucesivas, por ejemplo, la 1ª dilución a la mitad y luego la 2ª dilución a 1/5.

Ejemplo: la primera dilución se realiza tomando 50 g de la matriz con 50 ml del diluyente. Se mezclan y luego, para la segunda dilución, se diluyen 20 g de la primera dilución a la mitad con 80 ml del diluyente.

10.14 Ejemplos del número total de unidades necesarias para un ensayo de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento

Tabla 14. Ejemplo 1: Productos envasados al aire o al vacío. 3 lotes analizados

Tipo de unidades	Tipo de análisis	Número de unidades y fecha de análisis por lote	
Unidades de ensayo	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	11	3 en t_0 y 8 para la curva de crecimiento con 5 en la fase exponencial
Muestras de control alimentario	Detección de <i>L. monocytogenes</i>	1	1 en t_0
	Medición de las características fisicoquímicas		
	Recuento de la microbiota asociada		
Unidades de control	Medición de las características fisicoquímicas	2	1 en t_0 y 1 en t_{final}
	Recuento de la microbiota asociada		
	Control de temperatura	1	Durante todo el ensayo
Número total necesario por lote		15*	

Número total necesario para 3 lotes	45*
--	------------

(*) En función de la cantidad de producto en las unidades, es posible que sea preciso incrementar el número total para disponer de cantidad suficiente de producto para realizar todos los análisis necesarios.

Tabla 15. Ejemplo 2: Productos EAM: 3 lotes analizados

Tipo de unidades	Tipo de análisis	Número de unidades y fecha de análisis por lote	
Unidades de ensayo	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	11	3 en t_0 y 8 para la curva de crecimiento con 5 en la fase exponencial
Muestras de control alimentario	Detección de <i>L. monocytogenes</i>	2	1 en t_0 1 en t_0 1 en t_0 1 en t_0 y 1 en t_{final}
	Medición de las características fisicoquímicas		
	Recuento de la microbiota asociada		
	Medición EAM		
Unidades de control	Medición de las características fisicoquímicas	2	1 en t_0 y 1 en t_{final}
	Recuento de la microbiota asociada		
	Medición EAM		
	Control de temperatura	1	durante todo el ensayo
Número total necesario por lote		16*	

Número necesario para 3 lotes	48*
--------------------------------------	------------

(*) En función de la cantidad de producto en las unidades, es posible que sea preciso incrementar el número total para disponer de cantidad suficiente de producto para realizar todos los análisis necesarios.

10.15 Muestreo aleatorio único

El muestreo aleatorio único es un método basado en el principio de equiprobabilidad. Este principio garantiza que todas las unidades de ensayo del lote tengan las mismas probabilidades de extraerse. Para atender a este principio, el tamaño del lote (N) debe ser suficiente en comparación con el número (n) de unidades de ensayo: $n / N < 10 \%$.

Una forma de conseguir un muestreo aleatorio único consiste en numerar cada unidad del lote o, de forma más práctica, el «tiempo de producción» y, a continuación, utilizar números aleatorios para seleccionar el número de unidades de ensayo necesarias. Por ejemplo, los números aleatorios pueden obtenerse con una hoja de Excel aplicando la fórmula =RAND() (Imagen 10), o de tablas con números aleatorios.

Un ejemplo de un método utilizado para seleccionar de manera aleatoria 10 unidades de ensayo de un lote sería:

Dado que el tiempo necesario para producir un lote es de 6 horas, estas 6 horas pueden dividirse en periodos de 15 minutos. Si se introducen estas secuencias en una hoja de Excel y se utiliza la función aleatoria se puede obtener un número aleatorio para cada secuencia.

Sequence (min)	Random number	Sequence (min)	Random number
0	0.113907236	360	0.008288119
15	0.90796429	240	0.024013244
30	0.71092848	45	0.032814408
45	0.032814408	90	0.833295109
60	0.14898206	225	0.053738265
75	0.755967766	180	0.067550931
90	0.033295109	210	0.073529892
105	0.29198599	0	0.113907236
120	0.273082187	165	0.126254559
135	0.216391255	60	0.14898206
150	0.516336751	270	0.150485492
165	0.126254559	255	0.150878353
180	0.067550931	195	0.196984094
195	0.196984094	285	0.209547739
210	0.073529892	135	0.216391255
225	0.053738265	120	0.273082187
240	0.024013244	105	0.29198599
255	0.150878353	330	0.413613239
270	0.150485492	300	0.498294842
285	0.209547739	150	0.516336751
300	0.498294842	315	0.579404265
315	0.579404265	30	0.71092848
330	0.413613239	75	0.755967766
345	0.927097729	15	0.90796429
360	0.008288119	345	0.927097729

Imagen 10: Ejemplo de esquema de muestreo aleatorio con una hoja de Excel

Estos números aleatorios se clasifican en orden ascendente y se seleccionan los diez primeros. El muestreo se lleva a cabo seleccionando las diez unidades en los momentos seleccionados, al final de la línea de producción.