



LRUE Lm

Laboratorio de Referencia de la Unión Europea
para la *Listeria monocytogenes*

Laboratorio de la UE para *Listeria monocytogenes*. Documento de Orientación para evaluar la competencia de los laboratorios en la aplicación de pruebas de desafío y estudios de durabilidad, en relación con *Listeria monocytogenes*, en alimentos listos para el consumo

Nota: este texto se trata de una traducción oficiosa, siendo exclusivamente un instrumento de documentación. Las versión auténtica es la disponible en inglés.

Versión 2 - 7 de mayo de 2018

Helene BERGIS, Unidad *Salmonella* y *Listeria*

Bertrand LOMBARD, director del LRUE para la *Lm*

ANSES (Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria) - Laboratorio de seguridad alimentaria, situado en Maisons-Alfort,

LRUE para *Listeria monocytogenes*, Francia

En colaboración con los representantes de 7 Laboratorios Nacionales de Referencia para *Listeria monocytogenes*:

Marie Polet	Instituto de Salud Pública, Bélgica
Jens Kirk Andersen	Instituto Nacional de Alimentación - Universidad Técnica de Dinamarca
Bernadette Hickey	Laboratorio <i>Dairy Science Laboratory</i> , Departamento de Agricultura, Alimentación y Medio Marino, Irlanda
Francesco Pomilio	Instituto Zooprofiláctico Experimental de la región de Abruzos y Molise, Italia
Taran Skjerdal	Instituto Veterinario de Noruega - Sección de Microbiología en Alimentos y
Piensos, Noruega	
Elzbieta Mackiw	Instituto Nacional de Salud Pública - Instituto Nacional de Higiene, Polonia
Paul in't Veld	Autoridad de Seguridad Alimentaria y de los Productos de Consumo, Países Bajos.

CONTENIDO:

CONTENIDO:	2
Preámbulo.....	3
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Contexto legislativo.....	3
1.2 Alcance.....	4
1.3 Referencias.....	4
1.4 Prueba de desafío para evaluar el crecimiento potencial de la <i>L. monocytogenes</i>	5
1.5 Prueba de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento de la <i>L. monocytogenes</i>	6
1.6 Estudio de durabilidad	7
2. EVALUACIÓN DE LA EXPERIENCIA DEL LABORATORIO	7
2.1 Requisitos para el laboratorio.....	7
2.2 Revisión de la información facilitada por el EEA al laboratorio	8
2.2.1 General.....	8
2.2.2 Información necesaria para diseñar una prueba de estimulación	9
2.3 Informe de los estudios de vida útil.....	10
3 EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA TÉCNICA DEL LABORATORIO.....	11
3.1 Prueba de estimulación	11
3.1.1 Número de lotes	11
3.1.2 Cepas.....	11
3.1.4 Inoculación de unidades de ensayo.....	12
3.1.5 Almacenamiento de las unidades de ensayo.....	12
3.1.6 Mediciones fisicoquímicas de unidades de ensayo no inoculadas.....	13
3.1.7 Análisis microbiológicos.....	13
3.1.8 Determinación del crecimiento potencial y explotación de los resultados.....	14
3.1.9 Determinación de la velocidad máxima de crecimiento y explotación de los resultados.....	14
3.2 Estudios de durabilidad.....	15
3.2.1 Procedimiento de muestreo de alimentos	15
3.2.2 Condiciones de almacenamiento y análisis de los parámetros	15
3.2.3 Cálculo y explotación de los resultados.....	15
ANEXO 1 – Definiciones	16
ANEXO 2 - Ejemplo de una lista de revisión para evaluar la competencia técnica del laboratorio que realiza una prueba de estimulación	17

Preámbulo

Este documento de orientación ha sido elaborado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para *Listeria monocytogenes* (LRUE*Lm*), en colaboración con los representantes de 7 Laboratorios Nacionales de Referencia para *Listeria monocytogenes* (LNR *Lm*).

Se trata de la segunda versión de este documento de orientación, que sustituye a la primera versión, publicada en febrero de 2012. Esta segunda versión tiene en cuenta la versión de 2014 del LRUE para la *Lm* del Documento de orientación técnica sobre estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, así como la experiencia obtenida en la evaluación de estudios de vida útil.

El Comité Permanente de Plantas, Animales, Alimentos y Piensos (CE) (Comité de PAAP) aprobó este documento en su reunión del 3 de mayo de 2018.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto legislativo

El Reglamento (CE) n° 178/2002, de 28 de enero de 2002¹ establece los principios generales de la legislación alimentaria y de la seguridad alimentaria a nivel nacional y comunitario. Este reglamento también establece los procedimientos relativos a asuntos que tengan un impacto directo o indirecto en la seguridad alimentaria. El artículo 14 establece los requisitos de seguridad alimentaria: «No se comercializarán los alimentos que no sean seguros.», es decir, que «sea nocivo para la salud» o «no sea apto para el consumo humano». Este reglamento también establece las responsabilidades de los explotadores de empresas alimentarias (EEA) y establece el principio de que la responsabilidad principal de asegurar la conformidad de los alimentos recae en los explotadores de empresas alimentarias.

El Reglamento (CE) n° 2073/2005² de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece criterios de seguridad específicos para la *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (LPC) (categorías 1.1. a 1.3 del Anexo I de este Reglamento). Para los alimentos LPC, aparte de aquellos destinados a los lactantes o a usos médicos especiales, que pueden favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes* (categoría 1.2), se establecen dos criterios microbiológicos: un criterio cualitativo (ausencia en 25 g, antes de que el alimento haya abandonado el control del EEA que lo haya producido) o un criterio cuantitativo (límite de 100 UFC/g, para los productos que llegan al mercado durante su vida útil). Este criterio cuantitativo se aplica si el EEA puede demostrar a las autoridades competentes que el producto no superará el límite de 100 UFC/g a lo largo de su vida útil. Para ello, y de acuerdo con el Artículo 3.2, el EEA deberá realizar los estudios que se mencionan en el Anexo II de este Reglamento.

¹ DO L 31 de 01.02.2002, p. 1.

² DO L 338, 22.12.2005, p.1.

1.2 Alcance

Se han publicado dos documentos de orientación para la implementación del Reglamento (CE) n.º 2073/2005. Uno va dirigido a los EEA, para ayudarles a identificar el riesgo de *L. monocytogenes* en los alimentos LPC, mientras que el otro va dirigido a los laboratorios, para ayudarles a poner en marcha los estudios de vida útil:

- «Documento de orientación para los estudios de vida útil de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios» DG-SANCO 1628/2008;
- «Documento de orientación técnica sobre los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo del Laboratorio de Referencia de la UE para *Listeria monocytogenes*», versión 3, del 6 de junio de 2014.

El objetivo de este documento de orientación es establecer un enfoque armonizado para evaluar la competencia de los laboratorios que llevan a cabo estudios de vida útil (pruebas de desafío y estudios de durabilidad) para cumplir con los criterios de seguridad alimentaria establecidos en el Reglamento (CE) n.º 1831/2003 modificado.

Este documento está destinado al uso por parte de las Autoridades Competentes (AACC), los LNR y otras organizaciones que estén implicadas en valorar si los laboratorios pueden llevar a cabo estudios relacionados con *Listeria monocytogenes*. Esta evaluación puede llevarse a cabo mediante una auditoría, o puede basarse en un informe del estudio de vida útil.

En lo que respecta, más específicamente, al uso de este documento por parte de las AACC, estas pueden usarlo como herramienta para evaluar la implementación de la nota al pie 5 para el criterio 1.2 para *Lm* del Reglamento (CE) n.º 2073/2005 modificado, que especifica que el fabricante deberá demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 UFC/g durante su vida útil.

La primera parte (Capítulo 2) de este documento se centra en la experiencia que se requiere para diseñar, ejecutar e interpretar un estudio. La segunda parte (Capítulo 3) trata sobre la competencia técnica del laboratorio.

1.3 Referencias

A la hora de aplicar este documento, es fundamental consultar las siguientes normas: Deberá consultarse la edición más reciente.

- EN ISO 6887-1: Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y diluciones decimales.
- EN ISO 6887-2: Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carnes y productos cárnicos.
- EN ISO 6887-3: Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos pesqueros.
- EN ISO 6887-4: Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 4: Reglas específicas para la preparación de productos que no sean productos lácteos, pescados y productos pesqueros y carnes y productos cárnicos.
- EN ISO 6887-5: Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 5: Reglas específicas para la preparación de leche y productos lácteos.
- EN ISO 7218: Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para los exámenes microbiológicos.
- 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 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 de calibración.
- ISO 18787: Productos agrícolas y alimentarios. Determinación de la actividad del agua.
- ISO 21807: Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Determinación de la actividad del agua.
- Documento de orientación técnica sobre los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo del Laboratorio de Referencia de la UE para la *Lm*.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_technical_guidance_document_listeria_in_rte_foods.pdf
- Documento guía para los estudios de vida útil de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, Comisión de las Comunidades Europeas.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance_document_lysteria.pdf
- Reglamento (CE) N.º 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, modificado.

1.4 Prueba de desafío para evaluar el crecimiento potencial de la *L. monocytogenes*

Una prueba de desafío para evaluar el crecimiento potencial es un estudio de microbiología, que se

realiza en un laboratorio, en el que se mide el crecimiento de la *L. monocytogenes* en alimentos contaminados de forma artificial y almacenados en condiciones razonablemente previsibles desde la producción hasta el consumo (almacenamiento en el lugar de producción, durante la distribución, en el lugar de venta y a nivel del consumidor). Este crecimiento potencial (δ) se define como la diferencia entre el \log_{10} UCF/g al final de la prueba de estimulación, y el \log_{10} UCF/g al principio de la prueba. Para conocer más detalles, puede dirigirse a los documentos de orientación relacionados con los estudios de vida útil en alimentos listos para el consumo.

Para cumplir con los criterios microbiológicos para *Listeria monocytogenes*, establecidos en el Anexo I (categoría de alimentos 1.2 y 1.3) del Reglamento (CE) n.º 2073/2005, puede emplearse el crecimiento potencial (δ) en un escenario de tiempo y temperatura determinados:

- Para clasificar un alimento:
 - > en la categoría 1.2 «Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*», cuando $\delta > 0,5 \log_{10}$ UCF/g.
 - > en la categoría 1.3 «Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*», cuando $\delta \leq 0,5 \log_{10}$ UCF/g,
- Para evaluar el crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos LPC incluidos en la categoría 1.2, según unas condiciones razonablemente previsibles de almacenamiento entre la producción y el consumo.

El crecimiento potencial (δ) depende de muchos factores, entre los que destacan:

- las propiedades intrínsecas del alimento (p. ej. pH, contenido de NaCl, actividad del agua (a_w), microflora intrínseca, conservantes, etc.),
- las propiedades extrínsecas (p. ej. perfil de tiempo-temperatura, condiciones de envasado, etc.)
- estado fisiológico de la/s cepa/s inoculada, y el nivel de contaminación.

1.5 Prueba de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento de la *L. monocytogenes*

Una prueba de desafío para evaluar la velocidad máxima de crecimiento es un estudio de microbiología, realizado en un laboratorio, en el que se mide la velocidad a la que crece la *L. monocytogenes* en alimentos contaminados de forma artificial almacenados a una temperatura definida. Para conocer más detalles, consulte los documentos de orientación relacionados con los estudios de vida útil en alimentos listos para el consumo.

La velocidad máxima de crecimiento (μ_{max} , en logaritmo natural) se calcula a partir de la fase exponencial en la curva de crecimiento de la *L. monocytogenes*, que se obtiene a una determinada

temperatura, trazando el logaritmo natural de la población bacteriana con respecto al tiempo. La pendiente de la línea en esa fase es μ_{max} .

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

- la cepa inoculada,
- las propiedades intrínsecas del alimento (p. ej. pH, a_w , contenido de agua, contenido de NaCl, microflora intrínseca, componentes antimicrobianos, etc.),
- las propiedades extrínsecas (p. ej. temperatura, gases de la atmósfera, etc.).

La velocidad máxima de crecimiento puede calcularse mediante una regresión lineal o una regresión no lineal, y puede usarse para calcular directamente un aumento en el recuento de bacterias, o para utilizarse en un software de microbiología predictiva.

1.6 Estudio de durabilidad

Un estudio de durabilidad es un estudio microbiológico que se emplea para determinar la evolución de la población de bacterias que está presente de forma natural en los alimentos almacenados bajo unas condiciones razonablemente previsibles desde la producción hasta su consumo (almacenamiento en el lugar de producción, durante la distribución, en el lugar de venta y a nivel del consumidor).

2. EVALUACIÓN DE LA EXPERIENCIA DEL LABORATORIO

2.1 Requisitos para el laboratorio

El laboratorio que lleve a cabo los estudios de vida útil tendrá o podrá acceder a información relevante sobre microbiología alimentaria, ciencia y tecnología de la alimentación y modelos predictivos en microbiología y estadística necesarios para diseñar y realizar/llevar a cabo los estudios, interpretar los resultados y sacar conclusiones.

Para asegurar la solidez del estudio, se deberán tener en cuenta los conocimientos del EEA sobre sus productos con los conocimientos del laboratorio que se describen en el párrafo anterior.

La responsabilidad del laboratorio es la de diseñar estudios de vida útil basados en la información proporcionada por el explotador de empresas alimentarias. El explotador de empresas alimentarias tiene la responsabilidad de facilitar datos sobre los productos y las condiciones de almacenamiento (perfil de tiempo-temperatura) relevantes del lugar donde se vende el producto, mientras que el laboratorio necesita tener competencia suficiente como para ofrecer indicaciones basadas en la información facilitada por dicho EEA. El laboratorio deberá conocer el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, modificado; el Documento de orientación para los estudios de vida útil de *Listeria monocytogenes*, en alimentos listos para el consumo, de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de

noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (documento guía de DG-SANCO) y el Documento de orientación técnica sobre los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* del LRUE para la *Lm*.(Documento de orientación técnica del LRUE *Lm*) o las normas para las pruebas de desafío o los estudios de durabilidad aplicadas a nivel nacional, en caso de que existan.

El laboratorio y la persona responsable del estudio deberán identificarse. El personal implicado en los estudios deberá presentar evidencias de su competencia, como, por ejemplo, algún tipo de experiencia demostrable, cualificación o registro documental de su experiencia en estudios de desafío.

Todos los métodos analíticos (microbiológicos) que se utilicen en la realización de pruebas de desafío y estudios de durabilidad deberán especificarse, según lo establecido en el Anexo I del Reglamento (CE) n.º 2073/2005, y deberán realizarse empleando los métodos de referencia estandarizados o los métodos alternativos aceptados, de conformidad con el Artículo 5 de este Reglamento.

Se **recomienda** que el laboratorio esté acreditado para:

- la detección y recuento de *L. monocytogenes* en alimentos. Los métodos utilizados deberán cumplir con los requisitos especificados en el Artículo 5 del Reglamento (CE) N.º 2073/2005.
- análisis de parámetros físico-químicos (p. ej. actividad del agua y pH) y análisis microbiológicos, tales como el recuento de bacterias, que son de utilidad para la interpretación de los resultados de las pruebas de desafío.

Si el laboratorio no está acreditado para estos métodos, el nivel mínimo de calidad que se espera es: que tenga documentación que demuestre unas Buenas Prácticas de Laboratorio, que realice pruebas de control de calidad y que haya participado en pruebas de aptitud con un resultado satisfactorio.

Para aplicar modelos de microbiología predictiva, el laboratorio deberá conocer los paquetes de software disponibles y ser capaz de utilizar el software pertinente para los productos que se vayan analizar.

2.2 Revisión de la información facilitada por el EEA al laboratorio

2.2.1 General

La información del producto para realizar estudios de vida útil se recoge en el Documento de orientación de DG-SANCO. El EEA deberá facilitar información pertinente sobre el producto (p. ej. vida útil, rango de pH, rango de a_w , temperatura de almacenamiento, histórico de datos de estudios de vida útil-sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto y/o en estudios previos de vida útil). El laboratorio

también podrá facilitar información sobre el producto (especialmente sobre el pH y la a_w), basada en análisis realizados en el producto, antes de comenzar con las pruebas de desafío. El laboratorio deberá evaluar de manera crítica la información obtenida (al menos las que aparecen enumeradas más abajo). El laboratorio deberá aconsejar al EEA sobre la importancia de realizar o no un estudio de durabilidad, o una prueba de desafío para el alimento LPC en cuestión y deberá elaborar el protocolo experimental para la prueba de desafío, basándose en la información obtenida.

2.2.2 Información necesaria para diseñar una prueba de estimulación

- Selección de los lotes y del producto

Los lotes deberán representar la variabilidad de las condiciones de fabricación. Si la prueba de desafío está relacionada con una serie de productos, solo se analizará el producto que represente la posibilidad más desfavorable, es decir aquel producto que más favorezca el crecimiento de *L. monocytogenes*. La selección del producto que se considera que representa el peor caso deberá justificarse mediante un informe de ensayo.

Se deben considerar los siguientes elementos.

El estudio es importante para:

- o un único producto;
- o un producto que representa a una serie de productos.

Información en la etiqueta del producto

- o Nombre del producto o código identificable para un producto de nuevo desarrollo;
- o Temperatura de almacenamiento;
- o Peso del producto;
- o Lista de ingredientes;
- o Fecha de caducidad o fecha asignada para el nuevo producto;
- o Fotografía del producto y de la etiqueta.

Vida útil del producto

- o Fecha de producción;
- o Vida útil (fecha de caducidad o fecha asignada para el nuevo producto).

Histórico del producto

- o Producto nuevo, nueva fórmula;
- o Producto comercializado

Proceso de producción

- o Principales etapas (relacionadas con la inactivación de microorganismos o a una posible recontaminación).

Envase del producto

- o En atmósfera convencional
- o Al vacío;
- o En atmósfera modificada (composición gaseosa);
- o Propiedades del material empleado para el envase (p. ej. permeabilidad...).

Características fisicoquímicas del producto

- o Conjunto de datos (valores numéricos, periodo abarcado) para los parámetros de interés;
- o Parámetros de interés (incluyendo la media, la desviación estándar y el intervalo):
pH del producto; a_w del producto o salinidad (WPS); opcional: contenido de sal, grasas, azúcar; concentración de conservantes.

Características microbiológicas del producto:

- o Conjunto de datos para *L. monocytogenes* (valores numéricos, periodo abarcado, prevalencia, nivel de contaminación, datos sobre la superación del límite de 100 ufc/g);
 - o Conjunto de datos para microorganismos (distintos de *L. monocytogenes*) de importancia (valores numéricos, periodo que abarcan, nivel de contaminación):
Microflora total, bacterias lácticas, etc.;
 - Microflora tecnológica (adición de probióticos, cultivos iniciadores etc.).
- En el caso de los nuevos productos, el EEA y el laboratorio tendrán que hacer, como mínimo, una estimación de todos los elementos anteriormente mencionados, basándose en los ingredientes, condiciones del proceso y productos similares.

Caracterización de la cadena de frío:

- o Temperatura de almacenamiento y duración: en el centro de producción, desde la producción hasta la venta, en el punto de venta, y a nivel del consumidor;
- o Conjunto de datos (origen y valores numéricos, periodo de cobertura, percentil 75);
- o Destino del producto (mercado nacional y/o en otros Estados miembros de la UE).

Cuando los datos sobre la duración y la temperatura de almacenamiento no se encuentren disponibles, el laboratorio tendrá que emplear los valores por defecto que se especifican en el Documento de Orientación Técnica del LRUE para *Lm*.

2.3 Informe de los estudios de vida útil

Al concluir el estudio, el laboratorio presentará un informe en el que se establecen las condiciones bajo las que se llevó a cabo el estudio. Para las pruebas de desafío deberá incluirse al menos la información que aparece en el apartado k de la sección 3.2.1.2, o en el apartado g de la sección 3.2.2.2 del Documento de orientación técnica del LRUE *Lm*.

Además, el informe deberá incluir una sección dedicada a los resultados y una sección para la conclusión donde se describa la aplicabilidad y la limitación del estudio.

3 EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA TÉCNICA DEL LABORATORIO

3.1 Prueba de desafío

Los siguientes apartados identificados en el documento de orientación técnica sobre los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo del Laboratorio de Referencia de la UE para *Lm*, deberían aparecer especificados en el plan experimental para la prueba de desafío

3.1.1 Número de lotes

Generalmente se examinarán tres lotes en total. El laboratorio deberá analizar los lotes seleccionados, a lo largo de diferentes periodos de tiempo, para tener en cuenta la variabilidad entre lotes. Los tres lotes deberían representar la variabilidad en el proceso de producción e ingredientes. En el caso en el que se examinen menos de tres lotes, el motivo deberá justificarse en el informe.

Para determinar el número de lotes que han de examinarse, el laboratorio deberá utilizar:

- para el crecimiento potencial, un modelo reconocido y comúnmente aceptado de «límite de crecimiento/no crecimiento» (p.ej. la sección 3.2.1.2 del Documento de orientación técnica del LRUE para la *Lm*.)
- para la tasa de crecimiento, la calculadora de la variabilidad entre los lotes (<https://eurl-listeria.anses.fr>) un modelo reconocido y comúnmente aceptado de «límite de crecimiento/no crecimiento» (p.ej. la sección 3.2.1.2 del documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para la *Lm*).

3.1.2 Cepas

Se recomienda que el laboratorio lleve a cabo una prueba de desafío con distintas cepas, para tener en cuenta la variabilidad entre ellas.

- Número de cepas:
 - Se deberán utilizar, al menos, 2 cepas;
 - Se deberá proporcionar el origen de dichas cepas (incluyendo el producto en el que se ha aislado la cepa, si se conoce);
 - Se debe documentar la característica de crecimiento de una de estas cepas;
 - Dependiendo de la prueba de desafío que se realice, estas cepas deberán utilizarse en mezclas para el crecimiento potencial, o de forma individual para la tasa de crecimiento máxima.

3.1.3 Preparación del inóculo

El laboratorio deberá llevar a cabo una preparación del inóculo para evitar, en la medida de lo posible, introducir un sesgo a la hora de la inoculación de *L. monocytogenes*, de forma artificial, en el producto.

- Número de subcultivos:

- Se deben tomar dos subcultivos sucesivos, utilizando un medio adecuado, hasta alcanzar la fase estacionaria temprana. Incubar a la temperatura óptima de crecimiento (primer subcultivo) y a la temperatura de almacenamiento del producto, o cercana a ella, en la primera fase de la cadena de frío del producto (segundo subcultivo);
- Para cultivos mixtos (crecimiento potencial), deberán mezclarse las mismas cantidades de cada segundo subcultivo.
 - Inóculo:
 - La concentración del inóculo diana se obtendrá diluyendo el cultivo mixto (crecimiento potencial) o el segundo subcultivo (velocidad máxima de crecimiento) en suero fisiológico;
 - El inóculo deberá utilizarse inmediatamente, y su concentración se confirmará en el agar selectivo específico empleado para el análisis.

3.1.4 Inoculación de unidades de ensayo

De acuerdo con la información recabada, proporcionada por el EEA, el laboratorio deberá elegir entre los métodos disponibles en la lista del documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para la *Lm*:

- Inoculación en superficie o en profundidad;
- Con o sin desembalar el producto.

El laboratorio deberá justificar la importancia del método de inoculación para el producto analizado.

El laboratorio deberá utilizar equipamiento adecuado (p.ej. un septum/ membrana: dispositivo que sella el vial donde se prepara el inóculo y jeringas) para inocular los productos.

Se deberá respetar el nivel de contaminación del microorganismo diana (alrededor de 100 ufc/g), así como el volumen del inoculo (< 1 % de la masa de la unidad inoculada para análisis inoculada).

3.1.5 Almacenamiento de las unidades de ensayo

Este paso es de mayor importancia, sobre todo en pruebas de desafío para evaluar el crecimiento potencial. Las combinaciones de temperatura/duración de cada fase de la cadena del frío deberá estar justificada, de acuerdo con la tabla 3 de la sección 3.2.1.2 del documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para la *Lm*).

- El perfil de tiempo/temperatura estará de acuerdo con ~~per~~ la información proporcionada por el EEA (percentil 75 de los de datos de observación propia del explotador de empresas alimentarias - EEA);
- El perfil de tiempo/temperatura está basado en datos nacionales (percentil 75, donde se produce la cadena del frío);
- El perfil de tiempo/temperatura está definido como valores predeterminados (8 °C, 12 °C y

12 °C).

El laboratorio deberá demostrar que las unidades de ensayo se almacenan de acuerdo con el perfil de tiempo/temperatura que aparece en el protocolo.

3.1.6 Mediciones fisicoquímicas de unidades de ensayo no inoculadas

Para caracterizar el producto sobre el que se ha llevado a cabo la prueba de desafío, el laboratorio deberá medir, en unidades de ensayo no inoculadas, parámetros fisicoquímicos, tales como:

- pH, a_w , o NaCl y grado de humedad;
- Composición de gases;
- Otros parámetros.

El laboratorio deberá especificar en qué momento se han llevado a cabo dichos análisis y cuántas mediciones se han llevado a cabo en las unidades de ensayo no inoculadas (provenientes de los mismos lotes que los productos inoculados). Deberá utilizarse, al menos, una muestra perteneciente a cada lote, al principio y una muestra al final del estudio por lote.

3.1.7 Análisis microbiológicos

Los métodos utilizados deberán cumplir con los requisitos especificados en el Artículo 5 del Reglamento (CE) N.º 2073/2005.

Para evaluar el comportamiento de ~~la~~ *L. monocytogenes* introducida de forma artificial en el producto, el laboratorio deberá realizar un recuento de la concentración de *L. monocytogenes*, utilizando el método de referencia EN ISO 11290-2, o un método alternativo autorizado, de acuerdo con el método EN ISO 16140-2.

El laboratorio deberá asegurarse de que el límite inferior del recuento es de 10 ufc/g.

Para estar seguros de que la prueba de desafío se ha llevado a cabo en productos que estén libres de *L. monocytogenes*, el laboratorio deberá llevar a cabo el análisis para detectar la *L. monocytogenes* en unidades de ensayo no inoculadas, utilizando el método de referencia EN ISO 11290-1, o un método alternativo autorizado, de acuerdo con el método EN ISO 16140-2.

Para cada lote, al menos se debe utilizar una muestra al principio y una muestra al final del estudio. Si se detecta *L. monocytogenes* en las muestras, el laboratorio deberá informar al EEA de inmediato.

y si se ha completado la prueba de desafío (detección de *L. monocytogenes* al final del estudio), se deberá incluir una justificación en el informe, cuando los datos se utilicen para la evaluación del crecimiento potencial.

Para caracterizar el producto en cuestión, el laboratorio deberá realizar un recuento, utilizando unidades

de ensayo no inoculadas, de la microflora acompañante relevante pertinente para el producto: por ejemplo, la microflora total, bacterias lácticas o las levaduras, pero, por lo menos, la microflora total.

El laboratorio deberá documentar cuando se lleven a cabo estos análisis y cuántos análisis se han llevado a cabo a unidades de ensayo no inoculadas. Por lote, al menos será utilizada una muestra al principio y una muestra al final del estudio.

3.1.8 Determinación del crecimiento potencial y utilización de los resultados

Para calcular el crecimiento potencial de *L. monocytogenes* del producto analizado, el laboratorio deberá:

- Determinar la concentración de *L. monocytogenes* (en \log_{10} ufc/g) al principio y al final de la prueba de desafío utilizando tres muestras por lote, como se describe en el documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para *Lm*;
- Revisar que, en cada lote, desde el día 0, la desviación estándar del recuento de *L. monocytogenes* es $\leq 0.5 \log_{10}$ ufc/g. Si no es el caso, la prueba de desafío no es concluyente;
- Utilizar el cálculo del crecimiento potencial recogido en el documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para *Lm* (sección 3.2.1.2);
- Seleccionar, entre el crecimiento potencial obtenido para cada lote, el valor más alto como resultado final del estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el laboratorio deberá ser capaz de concluir que se ha producido un aumento significativo o no significativo de *L. monocytogenes* en el producto analizado. Cuando la diferencia entre el máximo y el mínimo de los 3 valores de un lote sea elevada, el laboratorio deberá incluir esta información en el informe de ensayo, junto con las recomendaciones del experto del estudio.

Además, debe notificarse cualquier observación que pueda influir en la validez de los datos o conclusiones.

3.1.9 Determinación de la velocidad máxima de crecimiento y utilización de los resultados

Para calcular la velocidad máxima de crecimiento de la *L. monocytogenes* en el producto analizado, el laboratorio deberá:

- Elaborar las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* (concentración de *L. monocytogenes* en \log_{10} ufc/g frente al tiempo) a una temperatura definida para dos cepas, analizadas individualmente;
- Aplicar una regresión lineal sobre puntos de los datos experimentales en fase exponencial, o ajustar una regresión no lineal a todos los puntos de los datos experimentales, utilizando un software microbiológico;
- El laboratorio deberá ser capaz de ofrecer un intervalo de confianza para la tasa de crecimiento, de acuerdo con el error estándar dado por el programa informático, y seleccionar, dentro de la tasa de crecimiento máxima obtenida para cada lote, el valor más alto como resultado final del estudio.
- El laboratorio deberá ser capaz de extrapolar el μ_{max} obtenido en el estudio a otra temperatura, utilizando la fórmula para el modelo secundario que figura en el documento de orientación técnica

del Laboratorio de Referencia de la UE para la *Lm*.

3.2 Estudios de durabilidad

Los estudios de durabilidad se llevan a cabo en lotes que pueden estar contaminados de forma natural por *L. monocytogenes*. Estos estudios difieren de las pruebas de desafío, ya que las muestras no están contaminadas artificialmente. Debido a la alta heterogeneidad de la contaminación por *L. monocytogenes* en los lotes, la selección aleatoria de muestras es esencial, ya que no todas las muestras pueden estar contaminadas. Es importante tener en cuenta la evaluación de las características del producto, la vida útil, y las condiciones de almacenamiento en frío para los estudios de durabilidad.

En los estudios de durabilidad, el número de muestras por encima de 100 ufc/g puede evaluarse en términos de frecuencia y tendencias.

3.2.1 Procedimiento de muestreo de alimentos

El laboratorio debe solicitar el histórico de datos del EEA (prevalencia de *L. monocytogenes*) para poder asesorar sobre el valor de realizar o no un estudio de la durabilidad. El laboratorio deberá ser capaz de orientar al EEA sobre los procedimientos de muestreo y muestras diana, y tener en cuenta el procedimiento de muestreo en la interpretación de los resultados. Para analizar más lotes, debe indicarse la distribución a lo largo tiempo entre los lotes.

3.2.2 Condiciones de almacenamiento y análisis de los parámetros

Ver los procedimientos de la prueba de desafío (de 3.1.5 a 3.1.7).

3.2.3 Cálculo y utilización de los resultados

El porcentaje de muestras que superen las 100 ufc/g debe calcularse y expresarse con un intervalo de confianza. Este intervalo de confianza puede obtenerse fácilmente utilizando un software, *p.ej.* [http://www.causascientia.org/math stat/ProportionCI.html](http://www.causascientia.org/math%20stat/ProportionCI.html).

Todos los datos medidos de *L. monocytogenes* deben incluirse en el informe para permitir la posibilidad de realizar cálculos adicionales de los datos.

En el caso de muestras con un contenido superior a 100 ufc/g al final de su vida útil, el laboratorio debe informar al EEA, y la fecha de dicha información debe incluirse en el informe de prueba.

ANEXO 1 – Definiciones

Lote:

Un grupo o conjunto de productos identificables, obtenidos a partir de un proceso determinado, en circunstancias prácticamente idénticas, y producidos en un lugar determinado, dentro de un período de producción definido.

Prueba de desafío

Estudio de la evolución de una población bacteriana inoculada artificialmente en un alimento

Cadena de frío

El sistema continuo que proporciona un almacenamiento refrigerado a alimentos perecederos, desde la producción hasta el consumo

Estudio de durabilidad

Estudio de la evolución de una población bacteriana presente, de forma natural, en un alimento

Crecimiento potencial

Diferencia entre el \log_{10} de la concentración de la población bacteriana, inoculada artificialmente, al final de una prueba de desafío y el \log_{10} de su concentración inicial.

Velocidad máxima de crecimiento

Inclinación de la curva que muestra la evolución del logaritmo natural de la población, en función del tiempo durante la fase exponencial.

pH

Una medida de la acidez o alcalinidad de un alimento. El pH 7 se define como neutro. Los valores de un pH inferior a siete se consideran ácidos y los valores superiores a siete se consideran básicos (alcalinos).

Alimento listo para el consumo (LPC)

Alimentos destinados, por el productor o el fabricante, al consumo humano directo, sin necesidad de cocción u otra elaboración eficaz para eliminar o reducir, a un nivel aceptable, los microorganismos en cuestión.

Vida útil

Tanto el período correspondiente al período anterior a la «fecha de caducidad», como a la fecha de consumo preferente, tal y como se definen, respectivamente, en los artículos 9 y 10 de la Directiva 2000/13/CE, relativa, entre otras cosas, al etiquetado de los productos alimenticios.

Actividad del agua (a_w)

El término se refiere al agua no ligada y disponible en un alimento, que no es lo mismo que el contenido de agua del alimento. El agua en los alimentos que no está ligada a otras moléculas puede favorecer el crecimiento de los microbios. La escala de actividad del agua se extiende de 0 a 1.0 (agua pura), pero la mayoría de los alimentos tienen un nivel de actividad del agua en el rango de 0.2, para los alimentos muy secos, a 0.99, para los alimentos frescos húmedos.

ANEXO 2 - Ejemplo de una lista de revisión para evaluar la competencia técnica del laboratorio que realiza una prueba de estimulación

Los siguientes artículos, que aparecen en el «documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para realización de estudios de vida útil en *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo», versión 3, del 6 de junio de 2014, deberían especificarse en el plan experimental de la prueba de desafío.

	Especificaciones del documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para la <i>Lm</i>	Información facilitada Si/No	Comentarios
Número y elección de los lotes			
Determinación del número de lotes que van a analizarse	Utilizar un software de microbiología predictiva. Límite de crecimiento/no crecimiento	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Número de lotes que van a analizarse	Utilizar un calculador de la variabilidad entre los lotes. • Al menos, 3 lotes	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	• 1 lote, si la probabilidad de crecimiento es $\leq 10\%$.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	• 1 lote, si la variabilidad entre los lotes es insignificante para la <i>Lm</i> .	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Selección de los lotes (si se van a analizar, al menos, 3 lotes).	Lotes con las características fisicoquímicas más favorables para el crecimiento.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Lotes repartidos a lo largo del tiempo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	

	Especificaciones del Laboratorio de Referencia de la UE para la <i>Lm</i> Documento de Orientación Técnica	Información facilitada		Comentarios
		Sí	No	
Cepas				
Número de cepas	Al menos, 2 cepas.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Selección de las cepas	1 cepa con un crecimiento conocido característico y otra/s cepa/s elegidas libremente (por ejemplo ambiental, brote, ...)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uso	En la mezcla	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Individualmente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Control de las cepas (bioquímico, genotípica, crecimiento, etc.)	control del procedimiento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Preparación del inóculo				
Preparación del subcultivos	1er subcultivo en el caldo (y(TSB o BHI) o 37 °C, hasta alcanzar la fase estacionaria.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Mezcla de subcultivos	2do subcultivo a una temperatura cercana a la temperatura de almacenamiento del producto, hasta alcanzar la fase estacionaria temprana. En cantidades iguales.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dilución de la mezcla o subcultivo secundario	En suero fisiológico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uso del inóculo	Inmediatamente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Recuento del inóculo	En agar selectivo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

	Especificaciones del Laboratorio de Referencia de la UE para la <i>Lm</i> Documento de Orientación Técnica	Información facilitada		Comentarios
		Sí	No	
Determinaciones físico químicas				
Parámetros medidos y número de muestras analizadas.	<p>* Medidas de pH en, al menos, 1 muestra en el Día₀ y en el Día_{final}.</p> <p>De acuerdo con un método estándar nacional o internacional</p> <p>* Medidas de la a_w (actividad del agua) al menos, 1 muestra en el Día₀ y en el Día_{final}</p> <p>De acuerdo con un método estándar nacional o internacional</p> <p>* Medidas (NaCl) y contenido de agua en, al menos, 1 muestra (en el Día₀ y en el Día_{final})</p> <p>* Medidas de la atmósfera gaseosa en el Día₀ y en el Día_{final}</p> <p>* Otras medidas de parámetros</p> <p>Adición de un volumen de suero fisiológico equivalente al volumen del inóculo</p>	<p><input type="checkbox"/></p>	<p><input type="checkbox"/></p>	

	Especificaciones del Laboratorio de Referencia de la UE para la <i>Lm</i> Documento de Orientación Técnica	Información facilitada		Comentarios
		Sí	No	
Análisis microbiológicos				
Detección de <i>Lm</i>	En, al menos, 3 muestras inoculadas en el Día ₀ y en el Día _{final} de acuerdo con: - método de referencia EN ISO 11290-1 - método alternativo validado, de acuerdo con la norma ISO 16140-2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Recuento de <i>Lm</i>	En, al menos, 3 muestras inoculadas en el Día ₀ y en el Día _{final} de acuerdo con: - método de referencia EN ISO 11290-2 - método alternativo validado, de acuerdo con la norma ISO 16140-2 Límite inferior del recuento en 10 ufc/g. Verificación de la homogeneidad de la contaminación en <i>Lm</i> en el Día ₀ ($\sigma \leq <0,5$).	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Recuento de la microflora total	En, al menos, 1 muestra no inoculada, de acuerdo con un método estándar nacional o internacional	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Recuento de la microflora específica (recomendada)	En, al menos, 1 muestra no inoculada, de acuerdo con un método estándar nacional o internacional	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

	Especificaciones del documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para la <i>Lm</i>	Información facilitada Si/No	Comentarios
Determinación del crecimiento potencial			
Método de cálculo	<p>Cálculo de la concentración de <i>Lm</i> en \log_{10}, en el Día₀ y en el Día_{final}</p> <p>Fórmula de cálculo utilizada para δ:</p> <p>Media de los resultados en el Día_{final} - Media de los resultados en el Día₀</p> <p>Determinación de δ para cada lote</p> <p>Se selecciona el valor más alto para δ</p> <p>Incremento significativo de <i>Lm</i> ($\delta > 0,5 \text{ Log ufc/g}$).</p>	<p><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>	
Determinación de la tasa de crecimiento			
Método de cálculo	<p>Determinación de la tasa de crecimiento para cada lote.</p> <p>Concentraciones de <i>Lm</i> expresadas en $\text{Log}_{10} \text{ ufc/g}$ y elaboración de las curvas de crecimiento de <i>Lm</i></p> <p>Cálculo de la tasa de crecimiento: Para una regresión lineal en, al menos, 5 fechas y con 3 recuentos por fecha de análisis.</p> <p><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>Para una regresión no lineal, utilizando un modelo primario de software de microbiología predictiva <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>Cálculo del intervalo de confianza La tasa de crecimiento obtenida es el valor superior de la confianza</p>	<p><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>	
Extrapolación de los resultados	<p>Extrapolación de la tasa de crecimiento obtenida a la temperatura del estudio a la tasa de crecimiento obtenida, utilizando otra temperatura <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>Determinación del crecimiento de <i>Lm</i> con cualquier perfil razonable de tiempo y temperatura, hasta el final de la vida útil del producto.</p>		

	Especificaciones del documento de orientación técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para la <i>Lm</i>	Información facilitada Si/No	Comentarios
Informe de análisis			
Objetivo del estudio		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Tipo de prueba de desafío		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Identificación del alimento	Nombre del producto o código identificativo para un nuevo producto desarrollado (NPD);	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Vida útil o fecha asignada para el NPD	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Características del producto (físicoquímicas y microbiológicas)	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Identificación de los lotes	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Fecha relacionada con la prueba de desafío	Número de lotes analizados	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Número de unidades analizadas por lote	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Masa de volumen de las unidades de ensayo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Cepas utilizadas	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Preparación del inóculo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Concentración del inóculo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Volumen del inóculo introducido por cada unidad de ensayo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Método de contaminación	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Fecha/s de la inoculación	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Duración del análisis e intervalo del muestreo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Temperatura/duración del almacenamiento y justificación	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Recuento y método de detección utilizado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Límite del recuento	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Valores físicoquímicos en el Día ₀ y en el Día _{final}	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Atmósfera gaseosa	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Concentración de la microflora acompañante en el Día ₀ y en el Día _{final}	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Concentración de <i>L. monocytogenes</i> en el Día ₀ y en el Día _{final}	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Crecimiento potencial por lote	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Tasa de crecimiento por lote	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Conclusión		