MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

agencia española de seguridad alimentaria y nutrición

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

Aprobado en Comisión Institucional del 18 de marzo de 2026
Modificado en Comisión Institucional del 30 de septiembre de 2026



Grupo Redactor: Grupo de Trabajo de coordinación del control de *Listeria monocytogenes*

Cristina Alapont Gutiérrez. Jefa de Servicio de Planificación y Análisis Alimentario. Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Laboratorios de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública. Conselleria de Sanidad. Generalitat Valenciana.
Antonio Español Pueyo. Jefe del Servicio de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental. Dirección General de Salud Pública. Gobierno de Aragón.
María Teresa Liza Baños. Técnica Superior del Área de Vigilancia de Zoonosis Alimentarias. Subdirección General de Control Oficial y Alertas. AESAN.
Cristina Ocerín Cañon. Jefa del Área de Vigilancia de Zoonosis Alimentarias. Subdirección General de Control Oficial y Alertas. AESAN.
Oscar Redondo Avilés. Asesor Técnico del Servicio de Seguridad Alimentaria. Secretaría General de Salud Pública y Promoción de la Salud. Consejería de Presidencia, Sanidad y Emergencias. Junta de Andalucía.
Alicia Rubio González. Técnico del Servicio de Planificación y Análisis Alimentario. Dirección General de Salud Pública. Generalitat Valenciana.
Paloma Sánchez Vázquez de Prada. Jefa del Área de Gestión de Riesgos Biológicos. Subdirección General de Gestión de la Seguridad Alimentaria. AESAN.
Marta Sanchidrián Pindado. Jefa de Servicio del Área de Gestión de Riesgos Biológicos. Subdirección General de Gestión de la Seguridad Alimentaria. AESAN.
Guillem Serrano Cachinero. Técnico del Servicio de Vigilancia, Control alimentario y Gestión de Alertas. Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Protección de la Salud. Departamento de Salud. Generalitat de Cataluña.
Eva Tolosa Muñoz. Jefa de Servicio de Vigilancia, Control alimentario y Gestión de Alertas. Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Protección de la Salud. Departamento de Salud. Generalitat de Cataluña.

Grupo de Expertos externos:

Avelino Álvarez Ordóñez. Profesor Titular de la Universidad de León.
Sara Bover Cid. Coordinadora del Área de Industria Alimentarias del Instituto de Investigación y Tecnología Alimentarias – IRTA. Girona.
Guillermo Cebrián Auré. Profesor Titular de la Universidad de Zaragoza.
Pablo S. Fernández Escámez. Catedrático de la Universidad Politécnica de Cartagena.
Alberto Garre Pérez. Investigador Ramón y Cajal de la Universidad Politécnica de Cartagena.
Alfredo Palop Gómez. Catedrático de la Universidad Politécnica de Cartagena.
Javier Pérez de Juan. Responsable del Departamento de Microbiología del Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria – CNTA. Navarra.

Índice

1. Introducción. 5
2. Objetivo. 6
3. Responsabilidades del operador de empresa alimentaria y otros actores. 7
3.1 Responsabilidades del operador de empresa alimentaria 7
3.1.1 Criterios de seguridad alimentaria respecto a *Lm* en ALC 7
3.1.2 Muestreo ambiental de *Lm* en las instalaciones de las empresas alimentarias 8
3.1.3 Estudio de vida útil 8
3.1.4 *Lm* en el SGSA del operador y estudios de vida útil 10
3.1.5 Colaboración entre empresas 11
3.2 Funciones de los laboratorios y otros asesores técnicos 12
3.2.1 Laboratorios 12
3.2.2 Asesores técnicos 13
4. Consideración de Alimentos Listos para el Consumo e información al consumidor. 14
5. Caracterización de ALC en función del riesgo de crecimiento de *Lm.* 20
5.1 Alimentos que no favorecen el crecimiento de *Lm* 24
5.2 Alimentos que demuestran que no favorecen el crecimiento de *Lm* mediante bibliografía científica 25
5.3 ALC que favorecen el crecimiento de *Lm*: estudios complementarios para validar la vida útil. 28
5.3.1. Selección del peor escenario posible 28
5.3.2 Microbiología predictiva 30
5.3.3 Ensayos de desafío (*challenge test*) 37
6. Estudios complementarios para verificar la vida útil 43
6.1 Estudios de durabilidad 43
7. Cómo combinar los datos generados por los estudios complementarios para determinar la vida útil en relación con *Lm* e integrarlos en el SGSA 45
7.1 Establecimiento de la vida útil 45
7.2 Validación de la vida útil 45
7.3 Verificación de la vida útil 46
7.3.1 Histórico de datos 46
8. Alimentos que se comercializan con límite no detección en 25 g hasta el final de su vida útil. 49
9. Verificación de los estudios de vida útil por parte del control oficial 50
9.1 Valoración oficial de los estudios desarrollados por las propias empresas: 50
9.2 Valoración de los estudios desarrollados por otras empresas o asociaciones. 51

ANEXO I- Base legal y documentación de referencia 52
ANEXO II – Listados de verificación 55
ANEXO III – Ejemplos de aplicación 68

1. Introducción.

La listeriosis invasiva es una zoonosis de transmisión alimentaria causada por la bacteria *Listeria monocytogenes (Lm)*, que afecta principalmente a poblaciones de riesgo (mayores de 65 años, personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas y neonatos). Aunque es poco frecuente y presenta baja prevalencia en comparación con otras zoonosis de transmisión alimentaria, la enfermedad suele ser grave y tiene altas tasas de hospitalización y mortalidad. La tendencia de los casos está aumentando debido al envejecimiento de la población.

La principal fuente de transmisión de la enfermedad es el consumo de alimentos contaminados con *Lm*, siendo los alimentos listos para el consumo (ALC) los identificados como los de mayor riesgo. Dentro de este grupo, la enfermedad suele estar asociada al consumo de una pequeña proporción de ALC que pueden favorecer el crecimiento de *Lm* y que presenta altos niveles de contaminación.

Un ALC, según el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, se define como un alimento destinado por el productor o el fabricante al consumo humano directo, sin necesidad de cocinado ni ningún otro tratamiento de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos.

Lm puede crecer incluso a temperaturas de refrigeración; sin embargo, este crecimiento puede evitarse o minimizarse gracias a las características intrínsecas del alimento, como la acidez, la humedad, la actividad de agua, el contenido de sal y los conservantes, así como a factores extrínsecos, como las condiciones de almacenamiento.

Es crucial que los productores de ALC lleven a cabo las acciones oportunas para controlar, por un lado, la contaminación por *Lm* durante los procesos de fabricación y manipulación, y por otro, su crecimiento en el producto hasta el final de su vida útil. Los ALC en los que *Lm* puede crecer y que no recibirán un tratamiento térmico durante el proceso de producción, ni otro tratamiento capaz de eliminar *Lm* son de especial preocupación. Por ello, es fundamental que los productores de este tipo de alimentos adopten medidas para controlar la contaminación inicial por *Lm* y comprendan el comportamiento de crecimiento de la bacteria en los ALC que elaboran, a fin de establecer una vida útil segura para sus productos. Deben ser capaces de demostrar que sus productos cumplirán con las disposiciones del Reglamento (CE) n.º 2073/2005 durante toda su vida útil.

La vida útil de un alimento se define como el periodo durante el cual un producto permanece seguro y mantiene sus especificaciones de calidad bajo las condiciones previstas de almacenamiento y uso. Los atributos sensoriales de calidad son determinantes para la durabilidad de muchos alimentos, que pueden volverse no aptos para el consumo humano al deteriorarse o alterarse, conforme a lo establecido en el artículo 14 del Reglamento (CE) n.º 178/2002. No obstante, el término “vida útil segura” cobra relevancia cuando el alimento puede representar un riesgo para la salud del consumidor debido a la posible presencia y proliferación de microorganismos patógenos o sus toxinas. La vida útil segura implica establecer una fecha de caducidad que indica el límite de tiempo hasta el cual el alimento puede consumirse sin riesgos. De acuerdo con el Reglamento (UE) n.º 1169/2011, dicha fecha debe indicarse en alimentos microbiológicamente muy perecederos, dado que su consumo, una vez

superada la fecha de caducidad puede suponer un peligro inmediato. La aplicación Bestdate, desarrollada por IRTA, puede ayudar a los operadores de empresa alimentaria (OEA) a decidir con criterios científicos si un alimento envasado debe ir marcado con fecha de caducidad o consumo preferente.

El establecimiento de la vida útil segura y la indicación de la fecha de caducidad resultan especialmente relevantes para los ALC, en particular aquellos susceptibles al crecimiento de *Lm.*

Para los ALC que pueden favorecer el crecimiento de *Lm*, es difícil predecir con un alto grado de certeza si el nivel será o no superior a 100 ufc/g durante la vida útil, sobre todo debido a la importante variación en las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) en el ámbito doméstico. El impacto en la salud pública dependerá de si se alcanzan los niveles superiores a 100 ufc/g. En la práctica, establecer la vida útil se considera parte del Sistema de Gestión de la Seguridad Alimentaria (SGSA) del OEA y tiene en cuenta los controles sobre los proveedores que garanticen la calidad de las materias primas y las tendencias de los resultados de los controles de las buenas prácticas de higiene aplicados en el entorno de fabricación.

Como este documento se centra en los estudios de vida útil en relación con *Lm* en ALC, conviene aclarar que cada vez que aparezca el término “vida útil” se está haciendo referencia a la vida útil segura.

2. Objetivo.

El objetivo de este documento es proporcionar información y orientaciones a los OEA dedicados a la fabricación, envasado y/o reenvasado de ALC, que deben desarrollar estudios de vida útil en relación con *Lm* que garanticen que los alimentos que comercializan son seguros.

Del mismo modo, se pretende que este documento sirva de guía a las Autoridades Competentes, para verificar la adecuación de los estudios de vida útil en relación con la *Lm* elaborados por los OEA conforme a lo dispuesto en el anexo II del Reglamento (CE) n.º 2073/2005. Asimismo, este documento puede ser un recurso útil para terceras partes implicadas en el desarrollo de estudios de vida útil de *Lm,* como personal de laboratorios o asesores técnicos.

La aplicación del presente documento es complementaria, en su caso, con la aplicación del documento “Directrices para la verificación del muestreo de Lm en zonas de trabajo y equipos utilizados en la producción de alimentos listos para el consumo”, aprobado en Comisión Institucional del 16 de diciembre 2020, porque la ubicuidad y la persistencia de este patógeno en el entorno de procesado, es un riesgo de contaminación de los alimentos que puede comprometer la vida útil establecida.

3. Responsabilidades del operador de empresa alimentaria y otros actores.

3.1 Responsabilidades del operador de empresa alimentaria

3.1.1 Criterios de seguridad alimentaria respecto a *Lm* en ALC

El Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión establece los criterios microbiológicos para los productos alimenticios. Los criterios específicos de seguridad alimentaria para *Lm* en ALC se recogen en las categorías de alimentos 1.1, 1.2 y 1.3 del Anexo I, Capítulo 1. La categoría de ALC en relación con *Lm* se determina en función de su capacidad para favorecer o no el crecimiento de Lm y de su uso previsto (es decir, si están destinados a los lactantes y a usos médicos especiales o no).

Los criterios de seguridad alimentaria definen la aceptabilidad de un producto o de un lote de alimentos aplicable a los productos comercializados. Cuando los análisis revelan resultados insatisfactorios y los productos no cumplen con los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria, el OEA deberá adoptar medidas correctoras según lo definido en sus SGSA e iniciar los procedimientos de retirada o recuperación de los alimentos no seguros del mercado, según corresponda. Cuando sea pertinente, los productos que aún no se encuentren en el comercio minorista podrán someterse a un procesamiento adicional para eliminar el peligro. Además, los OEA deben adoptar medidas para identificar la causa raíz de los resultados insatisfactorios y modificar en consecuencia los procedimientos basados en el APPCC.

Debido a la distribución desigual y a la posible baja prevalencia de un patógeno como *Lm* en un lote de alimentos, ningún plan de muestreo y análisis microbiológico puede garantizar completamente su ausencia en un lote. Por lo tanto, no es suficiente basar la gestión de la seguridad alimentaria únicamente en los análisis del producto final que arrojen un resultado de “no detectado” para el patógeno. De hecho, la aplicación de los criterios de seguridad alimentaria establecidos en el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 se considera una de varias opciones de gestión para garantizar que los alimentos ALC sean seguros.

La **contaminación microbiológica** suele estar distribuida de manera heterogénea en un lote de alimentos. Por lo tanto, en el ámbito del autocontrol del OEA, **no debe descartarse un primer resultado positivo repitiendo el análisis con una segunda muestra del lote o con una nueva porción** de la muestra original, ya que estos **nuevos resultados no pueden invalidar los resultados obtenidos previamente.** Este criterio aplica del mismo modo en el caso del muestreo efectuado por la autoridad competente.

La aplicación de las Buenas Prácticas de Higiene incluyendo un control adecuado de las materias primas debe utilizarse para minimizar la contaminación inicial. La aplicación del APPCC y el uso de etapas de procesamiento validadas inactivarán los peligros relevantes o reducirán su posible crecimiento. La formulación de alimentos **seguros “por diseño”** limitaría el crecimiento en caso de contaminación. **Una vida útil validada constituye una medida de control a considerar,** en combinación con las medidas previamente descritas, para garantizar la seguridad alimentaria.

Además, los criterios microbiológicos normalmente no son adecuados para la vigilancia regular de los límites críticos definidos en el APPCC. Los procedimientos de

vigilancia regular deben ser capaces de detectar la pérdida de control en los puntos críticos de control (PCC) y proporcionar esta información a tiempo para que se adopten medidas correctoras que permitan recuperar el control. Por lo tanto, la medición de parámetros físicos y químicos (como los perfiles de tiempo/temperatura, el pH y la actividad de agua (a_w)), que pueden realizarse en tiempo real durante la producción, debe utilizarse para complementar los análisis del producto final y verificar el cumplimiento de los criterios microbiológicos.

3.1.2 Muestreo ambiental de *Lm* en las instalaciones de las empresas alimentarias

Dado que *Lm* está ampliamente distribuida en el medio ambiente y puede persistir en los entornos de producción de alimentos, la implementación de un programa sólido de muestreo ambiental de *Lm* debe ser un componente clave del SGSA.

El artículo 5.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 establece que los OEA que elaboren ALC que pueden representar un riesgo de *Lm* para la salud pública deben tomar siempre muestras en las zonas de trabajo y en los equipos como parte de su plan de muestreo. Sin embargo, dicho artículo no proporciona un criterio microbiológico para evaluar los resultados ni indica qué acciones correctivas deben adoptarse.

Las orientaciones específicas sobre el muestreo de superficies y equipos utilizados en las operaciones alimentarias no forman parte del alcance de este documento, pero se abordan en el documento sobre Directrices para la verificación del muestreo de *Lm* en zonas de trabajo y equipos utilizados en la producción de alimentos listos para el consumo**.**

El muestreo ambiental de *Lm* es un componente indispensable dentro del SGSA, al igual que la determinación de la vida útil.

3.1.3 Estudio de vida útil

De acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 178/2002, el OEA es responsable de garantizar que los alimentos que pone en el mercado sean seguros. Esta responsabilidad implica cumplir con los requisitos establecidos en la legislación alimentaria y verificar que dichos requisitos se respeten en todas las etapas de la producción, transformación y distribución. De acuerdo con el mencionado reglamento, a la hora de determinar si un alimento es seguro, deberán tenerse en cuenta las condiciones normales de uso del alimento por cualquier operador intermedio y/o consumidor y en cada fase de la producción, la transformación y la distribución, así como la información ofrecida al consumidor, incluida la que figura en la etiqueta.

La obligación legal de que los productores de ALC realicen estudios de vida útil para *Lm* está establecida en el artículo 3, apartado 2 del Reglamento (CE) n.º 2073/2005 que establece que *cuando sea necesario, los explotadores de las **empresas alimentarias responsables de la fabricación** del producto **realizarán estudios** conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto es aplicable especialmente a los **alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de Listeria monocytogenes** y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria*.

Los estudios de vida útil de los que deben disponer los OEA responsables de la elaboración consistirán en lo siguiente:

- Especificaciones de las **características fisicoquímicas** del producto, como pH, a_w, contenido de sal, concentración de conservantes y tipo de sistema de envasado, teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento y transformación, las posibilidades de contaminación y la vida útil prevista.
- Consulta de la **bibliografía científica** y de los datos de investigación disponibles acerca de los aspectos que caracterizan el crecimiento y la supervivencia de *Lm*. Se ha de tener en cuenta la posible variación de estas características físico-químicas que puedan afectar al crecimiento de *Lm* tanto en el establecimiento elaborador, como durante toda la cadena de producción (en la que pueden intervenir otras empresas alimentarias) hasta llegar al consumidor final.

Cuando las características fisicoquímicas del alimento o su comparación con la bibliografía científica disponible u otros datos no permitan asegurar que el alimento no favorece el crecimiento de *Lm* y proporcionar suficiente información para apoyar la evaluación de la vida útil, será necesario realizar **estudios complementarios,** que tendrán en cuenta la **variabilidad** inherente al **producto**, el **microorganismo** en cuestión y las **condiciones** de transformación y almacenamiento.

Entre estos estudios pueden incluirse:

- **Modelos matemáticos** predictivos establecidos para el alimento de que se trate, utilizando factores críticos de crecimiento o supervivencia aplicables a *Lm* presente en el producto (microbiología predictiva).
- **Pruebas** para investigar la capacidad que tiene *Lm*, adecuadamente **inoculada**, para crecer o sobrevivir en el producto en diferentes condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles (ensayos de desafío).
- **Estudios para evaluar el crecimiento o supervivencia** de *Lm* que pueda estar presente en el producto durante su vida útil en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización.

El OEA es el responsable de establecer la vida útil. La determinación de la vida útil de los productos alimenticios siempre debe incluir la consideración de diferentes factores, tales como: sector alimentario, tipo de producto y tipo de proceso. La variabilidad inherente de los lotes fabricados y la variabilidad ligada a *Lm* también debe tenerse en cuenta, así como todas las **condiciones razonablemente previsibles durante la distribución, el almacenamiento y el uso, incluidas aquellas aplicadas por los operadores intermedios y los consumidores.**

En la práctica, el establecimiento de la vida útil se considera parte del SGSA del productor, y tiene en cuenta, entre otros:

- Los controles sobre los proveedores que garanticen la calidad de las materias primas y la tendencia de los resultados de los controles de materias primas.
- La confianza en los controles de las Prácticas Correctas de Higiene aplicados en el ambiente de fabricación, reflejados en los resultados del muestreo de superficies y equipos de procesado.
- La velocidad de deterioro microbiológico y el mantenimiento de la calidad organoléptica bajo las condiciones previsibles de almacenamiento y uso.

El objetivo de los estudios de vida útil para *Lm* es demostrar que el ALC cumple con el límite del criterio de seguridad alimentaria establecido para este patógeno hasta el final de su vida útil.

La demostración del cumplimiento del criterio de seguridad alimentaria mediante los estudios de vida útil puede realizarse de diversas maneras, y debe comenzar siempre por la correcta identificación de las características fisicoquímicas del alimento.

Para confirmar que la vida útil definida para cada alimento es correcta, además de la validación, es necesaria la verificación periódica incluida en el SGSA.

En este contexto es imprescindible distinguir dos conceptos:

Validación[1]: Obtención de pruebas que demuestren que una medida de control o una combinación de medidas de control, si se aplican adecuadamente, pueden controlar el peligro hasta lograr un resultado determinado.

Verificación[1]: Aplicación de métodos, procedimientos, ensayos y otras evaluaciones, además de la vigilancia, para determinar si una medida de control funciona o ha estado funcionando de la manera prevista.

3.1.4 *Lm* en el SGSA del operador y estudios de vida útil

Como paso previo para poner un ALC en el mercado, el responsable de este tendrá que determinar y **validar** su vida útil respecto al cumplimiento del criterio de seguridad definido para *Lm.*

Las empresas productoras de ALC deberán llevar a cabo estudios de vida útil y su revisión en las siguientes circunstancias:

- Desarrollo de alimentos nuevos o modificados.
- Desarrollo de procesos nuevos o modificados.
- Desarrollo de nuevos envasados.
- Cualquier cambio significativo en los ingredientes (en especial aquellos que constituyan un factor barrera, como aditivos, sal, azúcar, etc.) y/o el envasado de los alimentos existentes.
- Cambios en el uso previsto (p. ej: diferentes hábitos de consumo).
- Cambios en las instalaciones o en el equipo de producción que supongan un cambio sustancial en el producto ya existente (procesado, formulación, etc.)
- Cuando previamente no hayan realizado estudios de vida útil.
- Cuando los resultados del autocontrol o del control oficial indiquen que la vida útil del producto no es la idónea (por ejemplo, cuando se detecten niveles superiores a 100 ufc/g antes del final de la vida útil).

La empresa debe conservar la documentación de los estudios de validación de la vida útil y sus verificaciones como parte de las PCH y procedimientos APPCC. La

[1] Se puede encontrar información sobre la validación y la verificación en el documento de Codex: Directrices para la validación de medidas de control de la inocuidad de los alimentos. CAC/GL 69-2008.

documentación debe incluir todos los datos necesarios que se hayan empleado para determinar y validar la vida útil (características del producto, bibliografía científica usada, tipos y resultados de otros estudios de vida útil).

Es esencial que esta documentación esté disponible **de forma inmediata**, con el fin de que la empresa pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que sus ALC cumplen con el criterio de seguridad alimentaria establecido para *Lm* hasta el final de su vida útil. La empresa puede decidir el formato de esta documentación.

3.1.5 Colaboración entre empresas

Tal como indica el artículo 3 del Reglamento (CE) n.º 2073/2005, las empresas alimentarias podrán colaborar en la realización de estudios de vida útil. El reglamento indica, además, que las guías de prácticas correctas contempladas en el artículo 7 del Reglamento (CE) n.º 852/2004 podrán incluir directrices para el desarrollo de estudios de vida útil.

Así, los OEA pueden optar por realizar estudios de vida útil por su cuenta o colaborar con otros OEA que produzcan alimentos similares. En el marco de esta colaboración, es importante que la empresa tenga en cuenta las condiciones específicas de cada planta individual en la que se producen los ALC.

Las empresas que elaboren **productos similares en condiciones similares** pueden usar los resultados de los mismos estudios.

No obstante, el uso de un mismo estudio para productos obtenidos en diferentes plantas requiere considerar los siguientes aspectos:

- Los **productos deben tener las mismas características** (pH, a_w, contenido en sal, concentración de conservantes, tipo de envasado, microbiota asociada o cualquier otra característica importante para la supervivencia y el crecimiento de *Lm*). Si una o varias características difieren, los estudios no pueden usarse sin evaluar el efecto de las diversas características en la supervivencia y el crecimiento de *Lm.*
- La **formulación del producto debe ser la misma**, en caso contrario, deben evaluarse los efectos de los ingredientes sobre el crecimiento de *Lm.*
- El **proceso de producción debe ser muy similar**. Las etapas del proceso se deben comparar con detalle y evaluar el efecto de cualquier diferencia encontrada sobre la supervivencia y el crecimiento. Los estudios deben tener en cuenta la variabilidad inherente ligada al producto.
- Las **condiciones de almacenamiento, de uso previsto y la vida útil deben ser similares**, y en caso contrario, hay que evaluar el efecto de las diferencias sobre el crecimiento de *Lm.*
- La **microbiota asociada o los cultivos iniciadores deben ser idénticos**, y si no lo son, tener el mismo efecto sobre *Lm.*

La empresa debe demostrar a la autoridad competente que los productos y los procesos de producción son muy similares, o, **si los productos no son similares, demostrar cuales son las diferencias y qué efectos tienen sobre la supervivencia y el crecimiento de *Lm.*** La empresa puede emplear la bibliografía científica disponible y datos de investigación como consulta.

Si la documentación evidencia que los productos y procesos son similares, la empresa podrá utilizar los resultados del estudio para justificar la vida útil que ha establecido.

Cualquier cambio en el proceso de producción o en las condiciones previstas de uso requerirá una reevaluación de la validez del estudio colaborativo para ese producto específico.

Ejemplo de colaboración entre empresas:

En Francia, algunas organizaciones profesionales se han unido para clasificar ciertos tipos de productos dentro de la categoría 1.3 (ALC que no pueden favorecer el crecimiento de *Lm*). En 2008, la Confédération Générale de Roquefort presentó un protocolo para clasificar el queso Roquefort en esta categoría. El protocolo fue estudiado y validado por ANSES, y el Roquefort está ahora clasificado como “no favorecedor del crecimiento de *Lm*”.

3.2 Funciones de los laboratorios y otros asesores técnicos

3.2.1 Laboratorios

Los laboratorios que realicen estudios de vida útil 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, microbiología predictiva y estadística. La competencia estadística incluye la comprensión de la teoría de toma de muestras, diseño de experimentos y análisis estadístico de datos microbiológicos.

Se recomienda que el laboratorio esté acreditado para:

- La **norma EN ISO 11290-1 y EN ISO 11290-2: Detección y recuento de *Lm* en alimentos.** Los métodos utilizados deben cumplir con los requisitos especificados en el artículo 5 del Reglamento (CE) n.º 2073/2005.
- La **medición de parámetros fisicoquímicos** (por ejemplo, a_w y pH) y **análisis microbiológicos**.

Si el laboratorio no está acreditado para estos métodos, el nivel mínimo de aseguramiento de la calidad esperado es:

- Tener documentadas buenas prácticas de laboratorio
- Realizar pruebas de control de calidad metrológicas
- Haber participado con éxito en pruebas de aptitud

Para utilizar microbiología predictiva, el laboratorio debe tener conocimiento sobre los modelos disponibles y las herramientas informáticas, así como sobre su validez para el producto analizado y, además, demostrar su competencia técnica para utilizarlos.

Además, **los laboratorios que realicen ensayos de desafío y estudios de durabilidad deben contar con competencias específicas**, las cuales están descritas en el Documento de Orientación Técnica del EURL para *Lm* para evaluar la competencia de los laboratorios que realizan ensayos de desafío y estudios de durabilidad en relación con *Lm* en ALC.

Los laboratorios deben diseñar y realizar los ensayos de desafío o estudios de durabilidad en base a la información que facilitan los OEA. Los análisis de los ensayos de desafío deben realizarse siguiendo un sistema de garantía de calidad. Se recomienda que el **laboratorio cuente con la acreditación para la norma 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 *Lm*. También es recomendable que el laboratorio esté acreditado para la **norma EN ISO 20976-1**, que proporciona directrices y requisitos para realizar ensayos de desafío de productos alimenticios y piensos.

El laboratorio debe presentar los resultados de los ensayos de desafío (para la validación) o de los estudios de durabilidad (para la verificación), incluyendo el objetivo, los resultados y las conclusiones del comportamiento de *Lm* en el producto analizado, en un informe de ensayo de desafío que los OEA pueden usar como parte del estudio de validación de la vida útil, o en un informe de ensayo de durabilidad como parte de procedimientos de verificación de la vida útil.

3.2.2 Asesores técnicos

Cuando sea necesario que un OEA recurra a conocimientos externos, es fundamental que seleccione a un asesor adecuado que le brinde apoyo y que tenga los conocimientos y la experiencia necesarios (por ejemplo, en microbiología de los alimentos, ciencias de los alimentos, procesamiento de alimentos, estadística, y modelos y herramientas de microbiología predictiva).

En este sentido, tanto los asesores técnicos como los OEA deben tener en cuenta los siguientes puntos clave:

- Los modelos y/o herramientas de microbiología predictiva deben ser utilizados por personas formadas y competentes que estén familiarizadas con sus limitaciones y condiciones de uso.
- La elección del modelo y la herramienta, la naturaleza y el rango de los factores a considerar, así como los valores de entrada del modelo, deben estar claramente justificados. Siempre que sea posible, se deben elegir los modelos basados y/o validados en datos de matrices alimentarias frente a los modelos basados en datos de caldo de cultivo de laboratorio.
- Las predicciones del tiempo de latencia pueden ser menos robustas que las tasas máximas de crecimiento o las predicciones de probabilidad de crecimiento. Por tanto, salvo justificación completa, se debe elegir **el peor escenario posible que considere la ausencia de tiempo de latencia**.
- Cuando se utilicen herramientas de microbiología predictiva, el usuario debe identificar claramente el modelo utilizado, los parámetros de entrada, las hipótesis de simulación consideradas para obtener los resultados y cualquier otra información adicional necesaria para reproducir dichos resultados.

4. Consideración de Alimentos Listos para el Consumo e información al consumidor.

Se define ALC como un alimento destinado por el productor o el fabricante al consumo humano directo, sin necesidad de cocinado ni ningún otro tratamiento de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos, tal y como establece el Reglamento (CE) n.º 2073/2005. Es responsabilidad del OEA determinar si un alimento es listo para el consumo o no y garantizar la exactitud y claridad de la información alimentaria. La autoridad competente debe verificar que la clasificación y el etiquetado del alimento se hayan realizado correctamente.

Así, el OEA debe definir el producto que elabora y establecer las especificaciones de uso que va a transmitir a otros operadores intermedios a través de la ficha técnica y al consumidor a través de la etiqueta para un uso y consumo seguro. Para ello debe disponer de una descripción detallada del producto, que incluya:

- Denominación comercial
- Composición
- Formato (peso, cantidad, grosor, calibre, etc.)
- Presentación (entero, loncheado, etc.)
- Envasado (al vacío, atmósferas modificadas, etc.)
- Si es o no ALC
- Condiciones de fabricación, especialmente tratamientos térmicos, secado, ahumado, maduración, troceado, loncheado postratamiento, salado, curado, congelación, descongelación, tipo de envasado, etc.
- Modo de conservación y temperaturas de conservación esperadas (uso y abuso)
- Vida útil, instrucciones de uso que figuren en el etiquetado y condiciones razonablemente previsibles de uso (por ejemplo, debe tenerse en cuenta que, muchos productos vegetales congelados que teóricamente se deberían consumir cocinados, se consumen crudos)
- Usos previstos y otros usos razonablemente esperados (datos objetivos sobre hábitos de consumo alternativos conocidos)
- Especificaciones de uso, si procede

El OEA es el responsable de decidir el uso previsto del alimento que comercializa, teniendo en cuenta las condiciones de uso razonablemente previsibles. Podrá ser un ALC o un alimento que necesita un tratamiento previo a su consumo. Al evaluar dichas condiciones de uso, los OEA deben valorar la posibilidad de que sus productos no listos para el consumo (no ALC) sean consumidos de formas distintas a su uso previsto, teniendo en cuenta posibles variaciones en los hábitos de consumo que puedan deberse a factores culturales o a diferencias en las costumbres alimentarias. Estas variaciones podrían dar lugar a riesgos para la seguridad alimentaria que el OEA debe tener en consideración. La evaluación debe basarse en la información objetiva disponible sobre la probabilidad de que ocurran desviaciones como, por ejemplo, diferencias en las preferencias alimentarias o en los métodos de preparación entre distintos países o grupos de población, en particular los de mayor riesgo. Los resultados servirán para ofrecer información clara al consumidor, con el objetivo de reducir el riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos (tal como

se detalla más adelante) y también ayudarán a los OEA a decidir si el producto debe reclasificarse como ALC.

De conformidad con los artículos 9.1 (g), 9.1 (j), 25 y 27 del Reglamento (CE) n.º 1169/2011, en el envase de los productos alimenticios se deberá indicar:

- **Las condiciones de utilización** cuando, por la naturaleza del producto, **es poco probable que los consumidores hagan un uso inadecuado del alimento.** Así, para la mayoría de los alimentos no ALC, y sin perjuicio de otras disposiciones legales específicas, el envase debería indicar las condiciones del tratamiento térmico del producto antes de su consumo.
  En particular, el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 y el RD 1086/2020 establecen que la carne picada, los preparados de carne y los productos cárnicos, de todas las especies, destinados a ser consumidos cocinados, se deben etiquetar claramente para informar al consumidor sobre la necesidad de un **cocinado completo** antes de su consumo.
  Estas condiciones pueden no requerir el mismo nivel de detalle que las **instrucciones de uso** (véase el siguiente punto).

- **El modo de empleo (instrucciones de uso)** cuando resulte difícil hacer un uso adecuado del alimento sin dichas instrucciones. Esto puede aplicarse a situaciones en las que el **aspecto y/o denominación del alimento pueda inducir a error**, como en el caso de alimentos no ALC que se **asemejan a productos cocinados** o listos para el consumo, o cuando existan evidencias objetivas de **que se dan patrones de consumo alternativos** (p.ej. encuestas de consumo, brotes o casos documentados asociados al uso alternativo del producto en cuestión, publicidad, redes sociales, etc.).

En el etiquetado de los alimentos que requieren cocinado por parte del consumidor para controlar *Lm* y que incluyen el **modo de empleo (instrucciones de uso**) se debe utilizar una terminología que indique claramente que dicho tratamiento es necesario para la seguridad alimentaria y se deben mostrar esas **instrucciones de manera fácilmente accesible y de forma destacada**. Estas instrucciones deben ser **detalladas y específicas**, y proporcionar una orientación clara e inequívoca a los consumidores.

Cualquier instrucción de calentamiento basada en combinaciones específicas de tiempo y temperatura que figure en el envase debe estar **validada por las empresas alimentarias** (preferiblemente de conformidad con los requisitos de la norma ISO 20976-2:2022) para garantizar su eficacia en la consecución de la seguridad alimentaria, y los resultados de dicha validación deben documentarse como parte del SGSA de la empresa. Además, cualquier sugerencia de presentación, ya sea en forma de imágenes o de texto en el envase o difundida a través de otros canales (páginas web, redes sociales, etc.) deberá ser coherente con las instrucciones y no proporcionar información contradictoria, a fin de minimizar el riesgo de confusión de los consumidores y garantizar un consumo seguro.

Por lo tanto, si el alimento incluye en el etiquetado especificaciones sobre el **modo de empleo** que indiquen la aplicación de un tratamiento térmico hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones para valorar si, en función del tratamiento especificado, el alimento en cuestión debe considerarse como ALC o no:

- Si el tratamiento térmico garantiza la aplicación de una combinación de tiempo y temperatura listericida o no (70 ºC - 2 minutos o un tratamiento equivalente). De manera general, una reducción de 6 ciclos logarítmicos (conocida como valor D6) ha demostrado ser suficiente para eliminar o reducir *Lm* a un nivel aceptable. Ver ejemplo 1 (butifarra blanca) del anexo III.

- Si el tratamiento térmico está expresado de manera **comprensible** y es **realista y aplicable por parte del consumidor en un entorno doméstico**, por ejemplo: precalentar el horno a 220ºC y, posteriormente, cocinar el producto durante, al menos, 11 minutos.

- Si el **uso previsto** por el OEA está debidamente especificado y **no existe evidencia objetiva de un uso alternativo extendido**.

Una vez descrito el producto y definidas las condiciones de uso**, el OEA debe definir y justificar** si se trata de un **ALC o no:**

- Si el producto se puede consumir directamente sin necesidad de cocinado u otro procesado eficaz para eliminar o reducir *Lm*: **ES UN ALC** (p. ej., salmón ahumado).

- Si en el etiquetado del producto se especifican tratamientos térmicos destinados únicamente a la mejora de la palatabilidad, pero insuficientes para eliminar *Lm*: **ES UN ALC** (p. ej., un alimento en el que se indique que se puede calentar al gusto)

- Si el producto contempla en su etiquetado la necesidad de que el consumidor realice un tratamiento antes del consumo (correctamente validado por el OEA), pero las indicaciones del etiquetado no son lo suficientemente claras o concretas para que el consumidor haga un uso correcto del producto: **ES UN ALC** (p. ej., “recalentar de manera uniforme”, “calentar antes de servir”).

- Si el producto contempla en su etiquetado la necesidad de que el consumidor realice un tratamiento antes del consumo, pero ese tratamiento no ha sido validado por el OEA: **ES UN ALC.**

- Si el producto contempla en su etiquetado la necesidad de realizar un **tratamiento térmico (previamente validado)** eficaz para eliminar o reducir *Lm* a niveles aceptables, pero la etiqueta **no lo indica de forma clara, destacada y aplicable** por el consumidor y existe **evidencia objetiva de usos alternativos extendidos** entre los consumidores de la población de destino: se considerará que **ES UN ALC** (alimentos con aspecto evidente de producto terminado que puede inducir al consumidor a pensar que pueden consumirse directamente, p. ej., salchichas tipo Frankfurt, butifarra blanca, verduras congeladas para elaboración de *smoothies,* alimentos precocinados refrigerados envasados listos para cocinar como tortilla de patata, platos preparados para hornear, platos de pasta, pollo asado, platos de carne en salsa, etc.).

- Si el producto contempla en su etiquetado la necesidad de realizar un **tratamiento térmico (previamente validado)** eficaz para eliminar o reducir *Lm* a niveles aceptables y **la etiqueta lo indica de forma clara, destacada y aplicable** por el consumidor, aunque exista **evidencia objetiva de usos alternativos extendidos** entre los consumidores de la población de destino: se considerará que **NO ES UN ALC**.

- Si el producto contempla en su etiquetado la necesidad de que el consumidor realice un cocinado o tratamiento térmico eficaz para eliminar o reducir *Lm* (modo de empleo), se indican las instrucciones claramente (p. ej., tiempo y temperatura) previamente validadas por parte del OEA, y **no existe evidencia objetiva de usos alternativos extendidos** entre los consumidores de la población de destino: **NO ES UN ALC.**

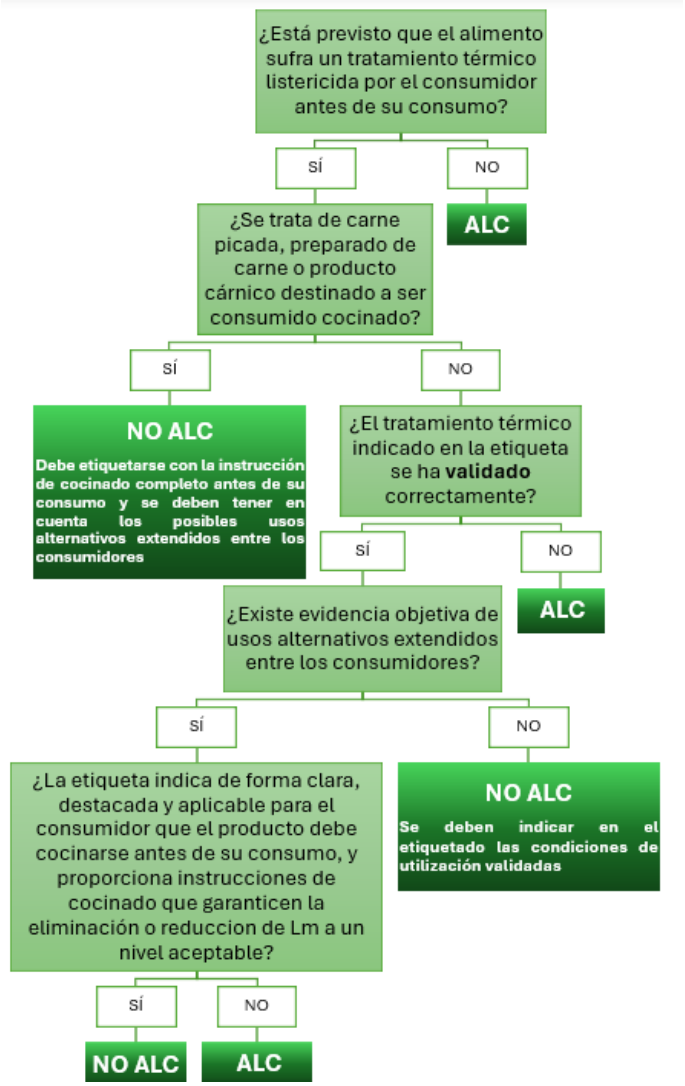


Figura 1. Árbol de decisiones para el OEA para determinar si un alimento es listo para el consumo o no.

En caso de que se determine que el alimento en estudio es un ALC, el Reglamento (CE) nº 2073/2005 establece **criterios microbiológicos de seguridad alimentaria para *Lm*.**

Tabla 1. Criterios microbiológicos aplicables a los ALC de conformidad con el Reglamento (CE) nº 2073/2005.

Categoría de alimentos	Plan de muestreo	Límites	Fase en la que se aplica el criterio
1.1. ALC destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales (4)	n=10, c=0	No detectado en 25g	Productos comercializados durante su vida útil
1.2. ALC que pueden favorecer el desarrollo de *L.m.* que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	n=5, c=0	a) ≤100 ufc/g	Productos comercializados durante su vida útil
		b) No detectado en 25g	Productos comercializados durante su vida útil[1]
1.3. ALC que no pueden favorecer el desarrollo de *L.m.* que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4)(8)	n=5, c=0	≤ 100 ufc/g	Productos comercializados durante su vida útil

Para concretar qué criterio microbiológico es aplicable, el siguiente paso será caracterizar el producto para determinar si permite o no el crecimiento de *Lm*.

[1] El criterio microbiológico 1.2.b) resulta aplicable a los productos durante su vida útil a partir del 1 de julio de 2026, de conformidad con el Reglamento (UE) 2024/2895 de la Comisión. Hasta entonces, es aplicable antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido.

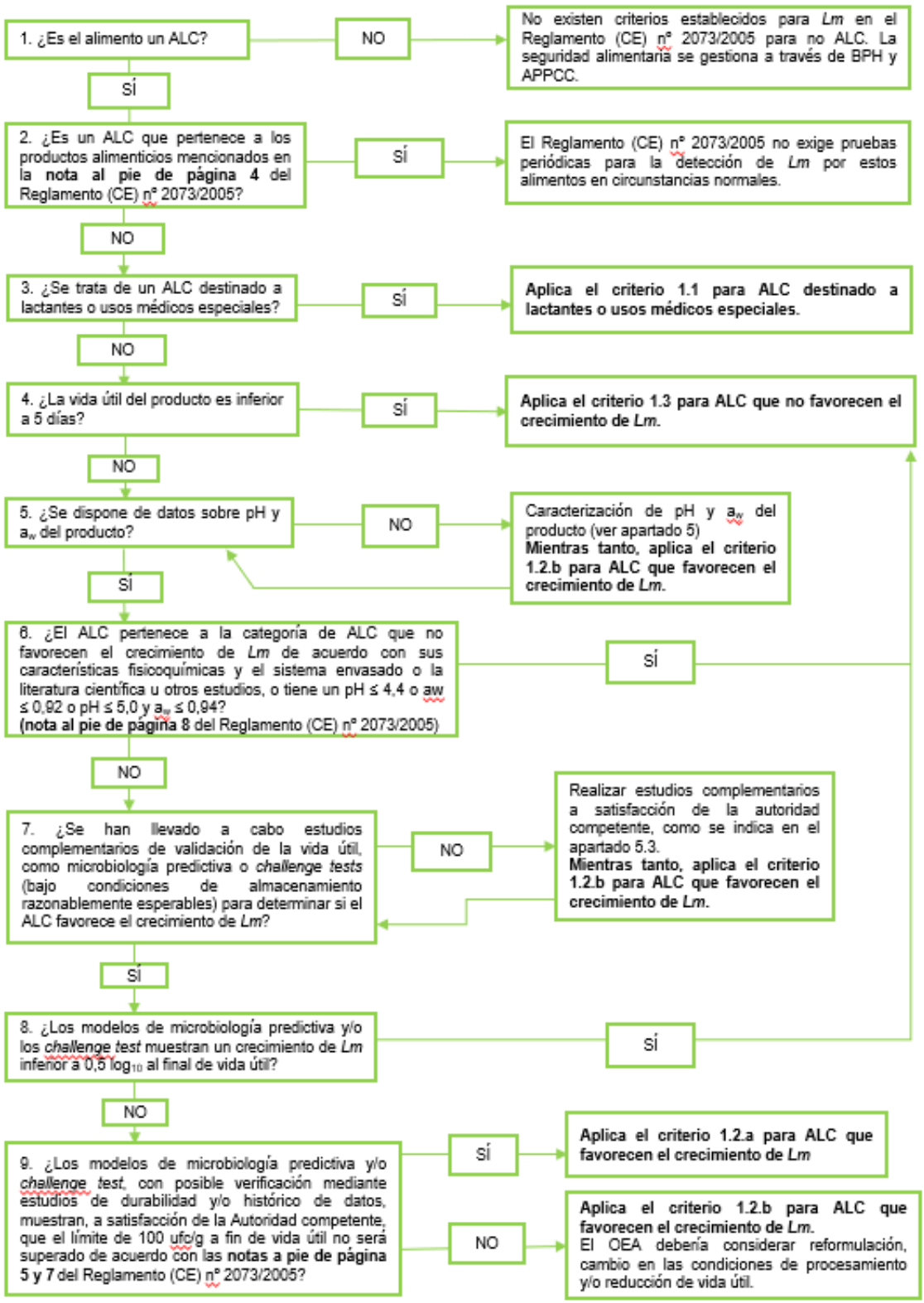


Figura 2. Árbol de decisión simplificado para determinar el criterio de seguridad alimentaria de Lm adecuado para un alimento listo para el consumo, de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión. Fuente: Guía SANCO/11510/2013, revision of 18 December 2025.

5. Caracterización de ALC en función del riesgo de crecimiento de *Lm.*

Las propiedades intrínsecas y extrínsecas de los alimentos influyen de manera decisiva en su seguridad y duración. Algunas contribuyen a prolongar la vida útil, mientras que otras pueden reducirla y elevar el riesgo de comprometer la inocuidad del producto.

Las características **intrínsecas** son propias de la composición del alimento, como el pH o la a_w. Por su parte, las características **extrínsecas** están relacionadas con el entorno externo de procesamiento y conservación, como la temperatura, la atmósfera de envasado o las condiciones higiénicas.

A continuación, se detallan las principales características intrínsecas y extrínsecas que pueden afectar al comportamiento y crecimiento de *Lm* en los alimentos:

FACTORES INTRÍNSECOS	FACTORES EXTRÍNSECOS
- pH - a_w* o contenido de sal/azúcar y humedad - Ácidos orgánicos, nitritos - Conservantes - Fenoles - Microbiota intrínseca - Estructura del alimento * a_w: es la cantidad de agua disponible para el crecimiento bacteriano	- Tª de la cadena de frío (fabricante, almacenamiento, transporte y consumidor) - Humedad relativa del aire (para alimentos no envasados o en envases permeables a la humedad) - Tipo de envasado del producto final (con/sin vacío, atmósfera modificada, y, permeabilidad del envase) - Composición de la atmósfera modificada en su caso

A continuación, se proporciona información sobre las características de crecimiento/supervivencia de *Lm* (específicas de la cepa) en medio de cultivo en caldo:

Tabla 2. Características de crecimiento/supervivencia de L. monocytogenes (específicas de la cepa) en medio de cultivo en caldo. Fuente: Guía SANCO/11510/2013, revision of 18 December 2025.

Factor [a, b]	Puede crecer			Sobrevive (pero no crece)[d]
	Mínimo (límite inferior de crecimiento)	Crecimiento óptimo[c]	Máximo (límite superior de crecimiento	
Temperatura (º C)	-2	30-37	45	-18
pH[e]	4-4.3	7	9.6	3.3-4.2

a_w	0.92 (0.90 con glicerol)	0.99	/	<0.9
Sal (NaCl)[f]	/	/	12	≥20
Composición de gases	Anaerobio facultativo y microaerófilo (capaz de crecer en presencia/ausencia de oxígeno) (p.ej., al vacío o en atmósfera modificada)			
Tratamiento térmico durante la producción del alimento	Se requiere una combinación de tiempo/temperatura de, por ejemplo, 70º C durante 2 minutos, para conseguir una reducción D-6 (6 reducciones logarítmicas, 10^6) en el número de células de *Lm*. Otras combinaciones de tiempo/temperatura pueden dar lugar a la misma reducción.			

a: los límites de supervivencia y crecimiento recogidos en la tabla se basan en investigaciones llevadas a cabo en laboratorio, en medios de cultivo en condiciones óptimas y deben usarse solamente como estimaciones del impacto en los alimentos.

b: estas cifras se han establecido en función de diferentes modelos y enfoques prácticos.

c: el óptimo se corresponde con las condiciones en las que Lm crece más rápido.

d: el periodo de supervivencia depende de la naturaleza del alimento, entre otros factores.

e: la inhibición de Lm depende del tipo de ácido presente.

f: basado en el porcentaje de NaCl en fase acuosa.

El Reglamento (CE) n.º 2073/2005 recoge, en las notas al pie 4 y 8 del capítulo 1 del anexo I, información que debe tenerse en cuenta a la hora de determinar qué criterio microbiológico de *Lm* es aplicable a un alimento.

La **nota 4** establece que, en circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto al criterio 1.3 para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo:

- los que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final)
- frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas
- pan, galletas y productos similares,
- aguas embotelladas o envasadas,
- bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares,
- azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate,
- moluscos bivalvos vivos,
- sal de cocina

Cuando se realice un tratamiento térmico del alimento en su envase final, **para poder aplicar la nota 4**, se deberá garantizar que la combinación de tiempo/temperatura aplicada da lugar a una reducción logarítmica que garantice la seguridad del producto. Si el proceso productivo no incluye ningún otro tratamiento térmico, se deberá garantizar una **reducción de 6 logaritmos (D-6**).

Si el producto durante su procesado se somete a un tratamiento que garantiza una reducción D-6, seguido de una etapa de exposición post-letal en la que *Lm* puede recontaminar la superficie del alimento o incluso multiplicarse, si se hace un segundo tratamiento en el envase final este deberá garantizar una reducción **en la superficie del producto**:

- Si no hay posibilidad de crecimiento de *Lm* porque la fase de exposición post-letal va seguida de forma inmediata por el envasado y, posteriormente, por la aplicación de un nuevo tratamiento en el envase final, se deberá demostrar una reducción **D-1**
- Si hay posibilidad de crecimiento de *Lm* porque el envasado y posterior tratamiento no es inmediato se deberá demostrar una reducción **D-5**, salvo que se justifique que una reducción menor es suficiente para garantizar la seguridad del alimento.

Ver ejemplo 1 (butifarra blanca) del anexo III.

Si el **alimento en estudio** es uno de los mencionados en la **nota 4**, **no será necesario que el OEA presente estudios de vida útil**, pero, en el caso del tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *Lm*, deberá presentar el estudio de validación de la eficacia del tratamiento. De manera general, tampoco será necesario que verifique regularmente el cumplimiento del criterio microbiológico 1.3.

La **nota 8** establece que se considera automáticamente que pertenecen a la categoría 1.3 los productos con las siguientes características:

- pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92,
- pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94,
- productos con una vida útil inferior a 5 días.
- otras categorías de productos, siempre que se justifique científicamente

Para la **correcta caracterización del alimento** hay que considerar la variabilidad de pH y a_w que puede haber dentro de un mismo lote y entre lotes del alimento y, además, la evolución de estos factores a lo largo de la vida útil (por ejemplo, en los quesos y otros productos madurados).

Es necesario disponer de un **mínimo de 5 valores de un mínimo de 3 lotes diferentes de producción (15 en total)**, analizados en un periodo en el que se ponga de manifiesto la posible variabilidad del factor que se está midiendo, teniendo en cuenta posibles variaciones estacionales o períodos de máxima producción que puedan afectar a los procesos. Si con estos 15 datos se calcula que la **probabilidad de que el pH y/o la a_w sean superiores al límite** establecido en la nota 8 (para ello se pueden utilizar las aplicaciones BestDate o Bioqura, como se explica más adelante) es **inferior al 5%,** el producto se podría incluir en la categoría 1.3 y aplicar el criterio microbiológico de 100 ufc/g durante la vida útil. Si la probabilidad calculada es mayor o igual al 5% sería necesario aportar más datos.

Si se dispone de suficientes datos obtenidos durante un periodo largo de tiempo de forma que se conoce la distribución de estos factores, el estudio de vida útil tomará en consideración **todos los valores disponibles** para determinar si

las características del producto se sitúan, con suficiente confianza estadística, por debajo de los límites.

Existen herramientas disponibles que permiten calcular la confianza estadística de que el pH y/o a_w del producto sea inferior al establecido en la nota 8. Estas herramientas incluyen:

- BIOQURA : se necesitan el valor de la media, la desviación estándar y el número de mediciones, para lo que se pueden utilizar las correspondientes funciones PROMEDIO y DESVEST en una hoja de Excel.
  - T102 (Muestras con a_w > límite) calcula la probabilidad que la a_w sea superior a un límite especificado.
  - T103 (Muestras con pH > límite) calcula la probabilidad que el pH sea superior a un límite especificado.

- Best Date: se necesitan solamente los valores de pH y a_w. Ver primera parte del ejemplo 8 (jamón cocido) del anexo III.

Nota: para poder introducir los valores de pH y a_w en la aplicación BestDate es necesario contestar previamente una serie de preguntas relacionadas con las condiciones de conservación, procesado y manipulación del alimento (si es congelado o no, si se somete a un tratamiento de letalidad, etc.), que la herramienta utiliza como criterios para indicar el tipo de fecha que requiere el alimento (caducidad o consumo preferente).

Ver ejemplo 2 (tomate rallado) del anexo III.

En el caso de **alimentos multicomponente** (por ejemplo, un sándwich) estos valores no se calcularán a partir de una muestra homogeneizada del producto completo, sino para cada uno de los componentes separados del producto una vez montado, esperando el tiempo suficiente para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes. Ver ejemplo 3 (sándwich) del anexo III.

En alimentos cuyas características intrínsecas se encuentran claramente fuera de los límites que permiten el crecimiento de *Listeria monocytogenes* no se considera necesario realizar una caracterización exhaustiva del alimento mediante un elevado número de muestras. En estos supuestos, una justificación documental apoyada en la composición, formulación, especificaciones del producto y bibliografía científica disponible puede resultar suficiente. Este sería el caso, por ejemplo, de alimentos deshidratados, harinas, frutos secos y otros productos con una actividad de agua muy baja, así como de encurtidos u otros alimentos con un pH muy ácido.

Asimismo, la caracterización del alimento no debería limitarse exclusivamente a parámetros como el pH o la a_w, sino que debe incluir cualquier factor intrínseco o extrínseco que se utilice para justificar la ausencia de crecimiento de *Lm* o la vida útil propuesta. En particular, cuando esta justificación se base en la presencia de aditivos, compuestos fenólicos, microbiota asociada u otros factores con capacidad inhibidora, deberá verificarse que los niveles presentes durante la fabricación habitual se mantienen dentro de los rangos considerados en la evaluación de la vida útil, de modo que el efecto inhibidor pueda considerarse consistente y representativo de las condiciones reales de producción. Cuando proceda, esta verificación podrá realizarse mediante el control de las cantidades incorporadas durante la formulación o el proceso

productivo, sin que sea necesario determinar analíticamente su concentración en el producto final en todos los casos, siempre que se haya validado previamente que la cantidad añadida permite alcanzar en el producto final la concentración necesaria para obtener el efecto tecnológico considerado en la evaluación.

5.1 Alimentos que no favorecen el crecimiento de *Lm*

Teniendo en cuenta la nota 8 del anexo I del Reglamento (CE) n.º 2073/2005 y los resultados obtenidos de la caracterización del producto, podremos concluir si el producto en estudio **directamente se puede clasificar como alimento que no favorece el crecimiento de *Lm***. En ese caso se deberá aplicar el criterio microbiológico 1.3. En estos supuestos, la vida útil del alimento no estaría relacionada con parámetros asociados al crecimiento de *Lm*, sino con otros peligros microbiológicos relevantes y/o criterios de calidad del producto. Siempre que no existan otros factores distintos de *Lm* que limiten la seguridad del alimento, podría emplearse la fecha de consumo preferente en lugar de la fecha de caducidad.

Las herramientas mencionadas (BestDate y Bioqura) calculan la probabilidad de que el pH y/o la a_w sean superiores al límite establecido en la nota 8. Cuando esta probabilidad es **inferior al 5%** (es decir, existe una confianza estadística superior al 95% de que el pH y/o la a_w es inferior al límite establecido), **el producto se podría incluir en la categoría 1.3 y aplicar el criterio microbiológico de 100 ufc/g durante la vida útil.**

La a_w y el pH deberán medirse periódicamente como parte de los procedimientos de **verificación regular**, constatando que los valores obtenidos son consistentes con las características del alimento descritas.

Si durante las actividades de verificación los resultados obtenidos no se ajustan a los de la nota 8, se considerará que el alimento favorece el crecimiento de *Lm* y será aplicable el criterio 1.2 del Reglamento (CE) 2073/2005.

En este caso, el OEA deberá realizar estudios complementarios para poder demostrar a satisfacción de la autoridad competente que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil, para las 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 (modo de empleo).

Mientras no se disponga de los resultados de los estudios complementarios para validar la vida útil, se debe aplicar a estos ALC el criterio 1.2.b (no detección en 25 g durante toda su vida útil, aplicable desde el 1 de julio de 2026) o establecerse una vida útil inferior a 5 días (criterio 1.3).

Los **ALC que no favorecen el crecimiento de *Lm* no son seguros *per se:*** algunos ALC que en su forma final no favorecen el crecimiento de *Lm* (como ciertos productos congelados o algunos productos cárnicos) se producen en entornos que sí favorecen el crecimiento del patógeno, debido a la presencia de agua y temperaturas adecuadas para su desarrollo. La contaminación y proliferación de *Lm* en las instalaciones de elaboración, así como su transferencia posterior a los alimentos en niveles capaces de provocar enfermedad, se consideran factores que han contribuido a brotes asociados a ALC que no favorecen el crecimiento del patógeno. Por ello, es imprescindible aplicar medidas de control eficaces en los entornos de producción para evitar o reducir al máximo la presencia, el crecimiento y la transferencia de *Lm* a ALC, incluso cuando la bacteria no pueda multiplicarse en el producto final.

5.2 Alimentos que demuestran que no favorecen el crecimiento de *Lm* mediante bibliografía científica

En la bibliografía científica se puede encontrar una amplia gama de datos científicos sobre *Lm* en los alimentos. Algunos ejemplos de bibliografía son los artículos científicos de revistas, los informes del ECDC y la EFSA sobre brotes de origen alimentario y estudios de vigilancia, los informes de grupos de investigación o los estudios realizados por otras empresas o recogidos a nivel nacional en la bibliografía disponible (por ejemplo, en normas comerciales y documentos de orientación de las autoridades competentes).
La bibliografía científica se puede consultar en plataformas como PubMed, Web of Science, Scopus, Google Scholar, etc.

El objetivo de consultar la bibliografía científica es obtener información sobre la supervivencia y/o el crecimiento de *Lm* en diversos productos y condiciones ambientales. Los OEA pueden utilizar la bibliografía científica para:

- Ofrecer una visión general de los datos disponibles para productos similares.
- Ayudar a identificar los factores que afectan al crecimiento/supervivencia de *Lm* en su propio producto.
- Orientar en la determinación de la vida útil de sus productos.
- Proporcionar pruebas para determinar si el producto favorece o no el crecimiento de *Lm*.
- Ofrecer información sobre si se requieren estudios adicionales o no.

En particular, cuando los valores de pH y a_w indiquen que el alimento puede favorecer el crecimiento de *Lm*, el OEA podrá recurrir a la consulta de la bibliografía científica y de los datos de investigación disponibles para demostrar que existen otros factores (intrínsecos o extrínsecos) que, de manera combinada, inhiben el crecimiento del patógeno. Si esto se demuestra, el ALC podría incluirse en la categoría 1.3 y sería aplicable el límite 100 ufc/g.

Para poder realizar este ejercicio de comparación es imprescindible que el OEA demuestre al control oficial que los productos y el proceso de producción comparten las **mismas características** que los de las referencias bibliográficas aportadas o que las del alimento en estudio son menos favorables para el crecimiento de *Lm*:

- Los **productos deben tener las mismas características** (pH, a_w, contenido en sal, concentración de conservantes, tipo de envasado, microbiota asociada o cualquier otra característica importante para la supervivencia y el crecimiento de *Lm*). En caso contrario, se debe evaluar el efecto de las diversas características en la supervivencia y el crecimiento de *Lm.*
- La **formulación del producto debe ser la misma**, en caso contrario, deben evaluarse los efectos de los ingredientes y aditivos sobre el crecimiento de *Lm.*
- El **proceso de producción debe ser muy similar**. Las etapas del proceso se deben comparar con detalle y evaluar el efecto de cualquier diferencia encontrada sobre la supervivencia y el crecimiento. Se debe tener en cuenta la variabilidad inherente ligada al producto y proceso de elaboración.
- Las condiciones de almacenamiento y la vida útil deben ser similares e incluir condiciones de conservación (según recomendaciones de las directrices del EURL-Lm), y en caso contrario, hay que evaluar el efecto de las diferencias sobre el crecimiento de *Lm.*
- La microbiota asociada o los cultivos iniciadores deben ser idénticos, y si no lo son, tener el mismo efecto sobre *Lm.*

Cabe señalar que los OEA deben tener conocimientos suficientes sobre estudios microbiológicos para evaluar de forma crítica si el artículo científico es relevante para el producto objeto de investigación. En algunos casos, puede resultar difícil encontrar información adecuada que se ajuste exactamente a los requisitos del producto (características fisicoquímicas, condiciones de elaboración, almacenamiento, temperaturas, etc.).

La bibliografía científica suele estar redactada en un estilo y un lenguaje que no son fácilmente comprensibles, por lo que puede ser útil el **asesoramiento de expertos cualificados con experiencia** si no se dispone de competencia interna. Por otra parte, es importante que las empresas del sector alimentario informen a los asesores a los que puedan recurrir para llevar a cabo el estudio bibliográfico sobre las características de sus productos, las variaciones realistas y las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso.

Para valorar la bibliografía científica aportada se tendrá en cuenta lo siguiente:

- El informe está avalado por expertos.
- El informe describe la metodología de búsqueda, la cual se ha realizado usando bases de datos reconocidas y minimizando la presencia de sesgos a la hora de seleccionar artículos. El control oficial replicará la búsqueda descrita por el operador de manera que se compruebe que no ha incurrido en sesgos de:
    - confirmación (seleccionando solo estudios que apoyen la hipótesis inicial y descartando aquellos que muestran capacidad de crecimiento, o mayor velocidad de crecimiento, bajo condiciones específicas)
    - disponibilidad (dando más peso a artículos recientes o fáciles de encontrar o solo disponibles de manera gratuita)
      Se debe tener en cuenta la fecha de elaboración del informe porque al replicar la búsqueda puede haber bibliografía posterior.

- La bibliografía que se presente debe ser el artículo completo, no siendo válida una cita o un resumen.
- Las características intrínsecas y extrínsecas del alimento objeto de estudio están correctamente identificadas y se demuestra que están cubiertas en la bibliografía científica aportada.
- Se justifica que el proceso de producción es similar a los de la bibliografía científica aportada.
- Se justifica que las condiciones de conservación (tiempo, temperatura y envasado) en la bibliografía científica aportada cubren las condiciones razonablemente previsibles de conservación del alimento objeto de estudio (Tabla 4).

Para garantizar que la información procedente de **la bibliografía científica sea aplicable al alimento en cuestión**, se recomienda verificar al menos los siguientes puntos:

- Que la **matriz alimentaria utilizada en el estudio sea representativa** del producto. Además de las características fisicoquímicas, se debe comprobar si el alimento ha sido cortado, picado, sometido a tratamiento térmico o modificado de alguna manera que lo haga más homogéneo que los productos reales. Los estudios realizados en caldo como matriz de ensayo pueden aportar información útil sobre diferencias relativas en temperaturas de almacenamiento, pero pueden no reflejar con precisión el comportamiento de crecimiento en el producto real.

- Que recoge resultados obtenidos con diferentes cepas de *Lm que* garanticen la validez y la aplicabilidad de dichos resultados para los fines del estudio.

- Que se han tenido en cuenta los **escenarios de temperatura** relevantes para las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso, incluido el peor escenario posible.

- Al interpretar los resultados de los ***challenge test*** de la bibliografía científica hay que tener en cuenta que se hayan llevado a cabo conforme a lo establecido en la Guía Técnica de EURL *Lm* (inóculo, cepas, temperaturas, etc.)

Criterios de validación:

El OEA que, basándose en la comparación de su producto con bibliografía científica, demuestre que su producto no permite el crecimiento de *Lm*, podrá incluirlo en la categoría 1.3 y aplicar el límite 100 ufc/g durante su vida útil, sin necesidad de estudios complementarios adicionales.

Si el OEA no ha podido encontrar bibliografía científica que permita realizar una comparación válida, deberá presentar otro tipo de estudios complementarios que permitan justificar el cumplimiento del límite de 100 ufc/g durante toda la vida útil del producto. Entretanto, deberá aplicar el criterio de no detección en 25 g durante la vida útil (1.2.b) o establecer una vida útil inferior a 5 días (criterio 1.3).

Ver ejemplo 4 (queso feta) del anexo III.

5.3 ALC que favorecen el crecimiento de *Lm*: estudios complementarios para validar la vida útil.

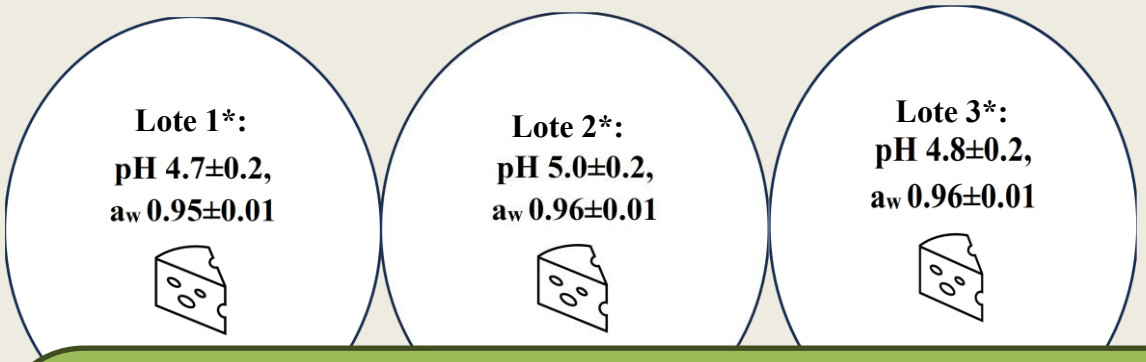
5.3.1. Selección del peor escenario posible

En los estudios de vida útil es fundamental considerar el peor escenario posible en cuanto a pH y a_w porque estos parámetros determinan la capacidad del patógeno para crecer en el alimento. Si se evalúa únicamente en condiciones favorables para la seguridad se corre el riesgo de subestimar la supervivencia o proliferación de la bacteria en situaciones reales en las que el producto pueda presentar valores menos restrictivos. Al aplicar el peor escenario, se asegura que las conclusiones del estudio contemplen el máximo potencial de crecimiento de *Lm*, garantizando que las medidas de control y la vida útil establecida protejan al consumidor incluso en las condiciones más desfavorables desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

El OEA debe confirmar que la variabilidad entre lotes es representativa de su producción basándose en datos históricos (ver apartado 5). El principio de selección del peor escenario entre lotes para realizar estudios complementarios de vida útil se ilustra en la Figura 3. No obstante, cuando se disponga de un número de datos mayor, suficiente y representativo de la variabilidad del producto y de las condiciones de producción se recomienda utilizar el **percentil 95** de los datos observados, siempre que se cuente, al menos, con **20 valores independientes**. A estos efectos, se consideran valores independientes aquellos que proceden de lotes distintos o de condiciones de producción diferentes, ya que son los que permiten reflejar adecuadamente la variabilidad real del producto a lo largo del tiempo.

Por el contrario, los datos obtenidos a partir de varias unidades analíticas de un número limitado de lotes (por ejemplo, 5 muestras de 3 lotes), aunque permiten evaluar la variabilidad intra e interlote, no reflejan adecuadamente la variabilidad existente entre un número amplio de lotes. Por este motivo, no se consideran suficientes por sí solos para calcular el percentil 95, ya que este requiere un conjunto de datos más amplio y representativo de la variabilidad de la producción.

Elija el producto alimenticio con las características fisicoquímicas más desfavorables (es decir, el lote con el pH y/o el valor a_w más altos).



El lote 2 de este ejemplo es el peor escenario. Existe variabilidad entre el pH y el a_w de los diferentes lotes. Para tener en cuenta la variación del proceso de producción y del producto, se recomienda analizar **5 muestras por lote de 3 lotes producidos en días diferentes (15 mediciones de pH y 15 de a_w)**. El OEA debe confirmar que la variabilidad entre lotes es representativa y que se tiene en cuenta el peor de los escenarios.
Cuando se realicen estudios complementarios para validar la vida útil deben utilizarse los valores más altos de pH y a_w obtenidos en estos estudios iniciales para representar el peor de los escenarios. Para más información, véase la sección 6.2.2.7 Medición de los parámetros fisicoquímicos del EURL Lm TGD (EURL Lm, 2021).
*Estos resultados son una media intra-lote de 5 mediciones de pH y a_w por lote.

Figura 3. Ejemplo de cómo seleccionar, entre varios lotes producidos, el producto alimenticio con la combinación más desfavorable de características físicoquímicas (por ejemplo, el pH más alto y la aw más alta. Fuente: Guía SANCO/11510/2013, revision of 18 December 2025.

Cuando el OEA dispone de una amplia gama de productos alimenticios, desde un punto de vista científico, puede ser aceptable agruparlos en categorías o familias con características similares antes de realizar estudios complementarios para validar la vida útil. Es fundamental que el OEA cuente con una justificación razonable para clasificar los productos alimenticios en grupos.

Se recomienda utilizar características clave como el pH, la a_w, los conservantes, el envasado (composición del gas y material de envasado), la microbiota, etc. para determinar la similitud de los productos. La autoridad competente exigirá pruebas

documentadas de estas características para justificar su agrupación en una sola categoría para su estudio posterior.

A la hora de agrupar productos, se deben seguir los siguientes pasos:

- Hacer un inventario de los productos, describir sus procesos de producción y determinar sus características intrínsecas (fisicoquímicas, microbiológicas, conservantes y cualquier otro aditivo, etc.) y extrínsecas (temperatura, envasado en atmósfera modificada, etc.).
- Se podría utilizar la microbiología predictiva para agrupar los productos y establecer el peor escenario dentro de un grupo basándose en las características fisicoquímicas (por ejemplo, la probabilidad de crecimiento de *Lm* según el pH y la a_w para una temperatura de almacenamiento determinada si no hay ningún factor adicional, como la presencia de conservantes, microbiota o ácidos orgánicos, que pueda inhibir o retrasar el crecimiento de *Lm*).

Basándose en estos pasos, los OEA pueden agrupar sus productos en categorías o familias eligiendo el producto con las condiciones más desfavorables dentro de ella para llevar a cabo estudios complementarios para validar la vida útil.

Ver ejemplo 5 (gazpacho) del anexo III.

5.3.2 Microbiología predictiva

La microbiología predictiva es el campo de estudio que combina elementos de la microbiología, las matemáticas y la estadística para desarrollar modelos que describen y, adecuadamente validados, predicen el comportamiento de los microorganismos en materias primas, productos semielaborados y productos finales. Se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones microbianas a factores ambientales son reproducibles, lo que permite predecir cómo se comportarán los microorganismos en condiciones que no han sido previamente ensayadas. Para ello hay que considerar factores específicos como: pH, temperatura, a_w, conservantes y la composición de gases del envasado, entre otros.

En relación con la concentración inicial de *Lm* a introducir en el modelo predictivo, con carácter general deberá emplearse una concentración inicial de 1 ufc/g, al tratarse de un escenario conservador para la estimación del posible crecimiento del microorganismo durante la vida útil del alimento.

No obstante, podrá emplearse una concentración inicial menor, siempre que el OEA disponga de un histórico de resultados de análisis de producto terminado, suficiente y representativo para justificar la concentración inicial elegida. Además, se tendrán en cuenta también los resultados de análisis de materias primas, superficies, etc. así como todos los resultados de control oficial. Esta justificación técnica deberá estar documentada en el marco del estudio de vida útil.

De esta manera y, teniendo en cuenta cómo los microorganismos responden, se desarrollan ecuaciones matemáticas que describen su comportamiento: crecimiento, supervivencia o inactivación.

Por lo tanto, la microbiología predictiva puede ser útil en la práctica para las siguientes aplicaciones:

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

Para predecir el comportamiento microbiano se pueden utilizar dos enfoques principales:

- **Modelos de crecimiento/no crecimiento:** se utilizan para **predecir la probabilidad de crecimiento del microorganismo** objetivo en condiciones específicas y en función de uno o más factores. Basándose en las características intrínsecas del alimento (por ejemplo, pH/a_w) y la temperatura de almacenamiento, este enfoque permite predecir la probabilidad de crecimiento de *Lm* en alimentos, comparándola con umbrales predefinidos:
    - Si la probabilidad de crecimiento calculada es **inferior al 10 %,** el producto se clasifica como **no favorecedor del crecimiento**.
    - Si la probabilidad está **entre el 10 % y el 90 %,** se requieren **estudios adicionales** para concluir (modelo cinético y/o ensayo de desafío).
    - Si la probabilidad es **superior al 90 %,** el producto se clasifica como **favorecedor del crecimiento**.

  Estos modelos son especialmente interesantes para estimar los límites de crecimiento con determinados factores que, presentes aisladamente, no inhiben el crecimiento, pero sí que lo pueden hacer cuando se presentan en combinación con otros factores barrera y pueden ayudar a los OEA a categorizar sus productos según el Reglamento (CE) nº 2073/2005, en las categorías 1.2 (favorecen el crecimiento) o categoría 1.3 (no favorecen el crecimiento).

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

  Entre los más utilizados tenemos: Sym'previous, Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP) y MRViewer.

- **Modelos cinéticos:** combinan modelos primarios y secundarios de velocidad de crecimiento para **predecir la concentración de microorganismos a lo largo del tiempo**, considerando distintos factores ambientales
  El objetivo de estos modelos es calcular, partiendo de un nivel inicial de contaminación (por ejemplo, al final de la producción), el tiempo necesario para alcanzar un umbral que respete el límite microbiológico legal.

Generalmente, es buena práctica comenzar con modelos de crecimiento/no crecimiento para el diseño del producto (formulándolo de manera que no favorezca el crecimiento). En caso de que favorezca el crecimiento de *Lm*, se podrían utilizar modelos cinéticos para demostrar que *Lm* se mantiene por debajo de 100 ufc/g al final de la vida útil, considerando el nivel inicial de contaminación.

Para productos que **favorecen el crecimiento**, es posible utilizar **modelos cinéticos** para demostrar que el límite de 100 ufc/g no se superará al final de la vida útil.

Predecir el tiempo de latencia (adaptación) de los microorganismos en un alimento es difícil, ya que se trata de un parámetro que, no solamente depende de las condiciones ambientales, sino también del estado fisiológico del microorganismo en el momento de contaminar el producto. Dependiendo del estado fisiológico de *Lm*, que suele estar muy bien adaptada al producto y al ambiente de procesado (protegida con biofilms) y de las diferencias entre las condiciones de origen (fuente de contaminación) y las de llegada (alimento contaminado), el tiempo de latencia puede variar entre 0 (se inicia el crecimiento sin fase de adaptación) e infinito (no hay crecimiento). Por estos motivos, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria se requiere una actitud conservadora y **se debe considerar que la fase de latencia es cero**.

Los modelos cinéticos pueden tener dos tipos de enfoque:

- **Determinista:**
  Se combinan valores únicos de pH, a_w y perfil de temperatura con la concentración inicial para predecir la concentración de *Lm* a lo largo del tiempo hasta el final de la vida útil. Se obtiene un valor único de concentración de *Lm* al final de la vida útil, que puede compararse fácilmente con el límite de 100 ufc/g.

- **Estocástico:**
  Los factores se describen mediante distribuciones que reflejan las distintas fuentes de variabilidad incluidas en la predicción. En este caso, al considerar la variabilidad de cepas, el procesado, la variabilidad intra e inter-lotes en los productos alimentarios evaluados, y las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso, se obtiene una distribución que caracteriza la concentración de *Lm* al final de la vida útil. En este caso, se puede comparar un percentil alto de la distribución de salida con el límite de 100 ufc/g para evaluar el cumplimiento del criterio.

Al considerar modelos cinéticos, se pueden distinguir dos grupos principales, en función de la matriz empleada:

- **Modelos basados en datos obtenidos en medios de cultivo (líquidos):** se usan para describir el posible impacto de varios factores y son una buena opción para evaluar su efecto relativo en ausencia de datos de *challenge test* en el alimento estudiado; algunos **pueden no describir con precisión el comportamiento microbiano en el alimento** (por ejemplo, al no considerar el efecto de microbiota competitiva), ya que, en un medio líquido el crecimiento es más rápido, llevando a una previsión de vida útil más corta de la que en realidad podría tener en el alimento. **Por ello, de manera general, aunque estos modelos proporcionarían una mayor seguridad alimentaria, por sí solos no son útiles para validar la vida útil.**

- **Modelos validados para el tipo de alimento a estudiar:** se desarrollan utilizando datos de *challenge test* y luego se emplean para predecir el comportamiento microbiano considerando las características fisicoquímicas del alimento como parámetros de entrada, junto con la temperatura de almacenamiento. Los modelos más robustos están validados en alimentos. Estos modelos pueden describir eficazmente el impacto de las condiciones de almacenamiento en un alimento específico, pero su capacidad para describir el impacto de la variabilidad de las características fisicoquímicas del alimento, o, para hacer predicciones en otros alimentos son algunas de sus limitaciones.

Para llevar a cabo un estudio de microbiología predictiva, el OEA deberá aportar la información a la que se hace referencia en los apartados 4 (Consideración de Alimentos Listos para el Consumo e información al consumidor) y 5 (Caracterización de ALC en función del riesgo de crecimiento de *Lm)* de este documento.

En todos los casos, es importante **documentar la justificación de los modelos utilizados**, los valores de los parámetros de entrada para generar la predicción del modelo y la capacidad predictiva (validez) para el tipo de alimento y condiciones objeto de estudio. Para garantizar un uso correcto, es esencial conocer las características fisicoquímicas del alimento (pH, a_w, concentración de sal) así como las temperaturas de almacenamiento del producto durante toda su vida útil en **condiciones razonablemente previsibles** de distribución, almacenamiento y uso

Siempre que sean usados con precaución por **personal experto y con capacidad para valorar su adecuación y limitaciones en función de cómo se han desarrollado y validado**, los modelos predictivos son una valiosa herramienta para estimar el crecimiento de *Lm* en los alimentos.

En los últimos años se han logrado avances significativos en este campo, especialmente en la recopilación de datos y el desarrollo de modelos para predecir el crecimiento de *Lm* en alimentos. Actualmente, existen datos y modelos disponibles en la bibliografía, y algunos han sido implementados en software de fácil manejo para facilitar su acceso a un público más amplio. Algunos de los más ampliamente utilizados son:

Tabla 3. Lista no exhaustiva de herramientas de software disponibles para predecir el crecimiento de Lm. Fuente: Guía SANCO 11510/2013, revision of 18 December 2025.

Software	Acceso	Coste	Publicación asociada	Metodología del modelo	Factores incluidos	Matriz
FSSP	http://fssp.food.dtu.dk/	Gratis	(Dalgaard, and Mejlholm, 2019)	D	Temperatura (°C), NaCl en fase acuosa (%), pH, componentes del humo, fenol (ppm), CO_2 (%) en el espacio de cabeza en equilibrio, nitrito (mg/kg), ácidos orgánicos (ppm) en fase acuosa (ácido acético, benzoico, cítrico, diacetato, láctico, sórbico), con o sin bacterias ácido lácticas.	Productos cárnicos y de la pesca refrigerados.
Growth Predictor	https://skandamis.shinyapps.io/Microbial-Growth-Predictor-Dashboard/	Gratis	https://zenodo.org/records/14281569	D+E	Temperatura, pH, aw, nitrito, CO_2, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos (p. ej., láctico, acético) y cualquier compuesto inhibitorio con su Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).	Los modelos pueden calibrarse para diferentes alimentos ajustando el valor de μ_{ref}.
IPMP Dynamic Prediction	http://www.ars.usda.gov/Main/Docs.htm?docid=25312	Gratis	(Huang, 2014)	D	Temperatura.	Carne de cerdo cocida, salchichas de vacuno, huevos cocidos, huevas de salmón, melón fresco cortado.
	https://symprevius.eu	Comercial	(Couvert et al., 2017)	D+E	Temperatura, pH, aw, nitrito, CO_2, ácido láctico y cualquier	Salmón ahumado en frío.

Sym'Previus					compuesto inhibitorio con su CIM.	Los modelos pueden calibrarse para cualquier alimento ajustando el valor de $\mu_{opt.}$
MicroHibro	https://www.microhibro.com	Gratis (requiere registro	Cubero-González, S., et al. (2019); Pérez-Rodríguez, F. et al (2025)	D+E	Temperatura, pH, aw, nitrito, CO_2, conservantes, atmósfera de envasado, aw, NaCl, ácidos orgánicos (p. ej., ácido láctico), series tiempo-temperatura.	Diferentes categorías de alimentos, incluidos carne, pescado, lácteos y ALC. Los modelos permiten evaluar el crecimiento, inactivación, supervivencia y módulos probabilísticos de QMRA. Los usuarios avanzados pueden introducir modelos y/o validarlos/calibrarlos.
ComBase	https://combase.errc.ars.usda.gov/ Nota: Modelos desarrollados a partir de datos de *L. monocytogenes* y *L. innocua*	Gratis	(Baranyi & Tamplin, 2004) Baranyi J. and Roberts T.A. (1994).	D	• Temperatura, pH y aw/NaCl • Temperatura, pH, aw/NaCl, CO_2 • Temperatura, pH, aw/NaCl, ácido láctico (ppm) • Temperatura, pH, aw/NaCl, nitrito (ppm)	Medio de cultivo.

D: Determinista; E: Estocástico

Para llevar a cabo simulaciones, hay que tener en cuenta las siguientes **consideraciones**:

- Escoger el **modelo más adecuado** al objetivo del estudio (ver Tabla 3) que deberá incluir los **factores más relevantes** para el producto y tener un intervalo que incluya los **valores de las características del producto**, que previamente se habrán tenido que determinar (ver apartado 5). Se debe tomar como referencia el peor escenario posible (ver apartado 5.3.1).
- Tener en cuenta las **condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso del alimento a nivel de fabricación, de venta al por menor y de consumo**. La temperatura utilizada en la simulación tiene que estar debidamente justificada y documentada por los OEA (se recomienda utilizar el percentil 95 de los datos observados). Si se desconocen las temperaturas reales de almacenamiento del producto en cuestión, los explotadores de empresas alimentarias deberían aplicar las temperaturas que se recogen en la Tabla 4:

Tabla 4. Diagrama de flujo de las condiciones de almacenamiento durante la cadena de frío. Fuente: Guía Técnica del EURL Lm (EURL Lm, 2021).

Fase de la cadena de frío	**Temperatura de almacenamiento (incubación)**	**Duración de almacenamiento**		
			Vida útil (VU) < 21 días	**Vida útil (VU) > 21 días**
A nivel de fabricación	Temperatura justificada por la información detallada (*) o, si se desconoce, **7ºC**	Duración justificada por la información detallada	Si se desconoce, 1/3 VU	Si se desconoce, 7 días
A nivel minorista	Temperatura justificada por la información detallada (**) o, si se desconoce, **7ºC**	Duración justificada por la información detallada	Si se desconoce, 1/3 VU	Si se desconoce, ½ (VU-7)
A nivel de consumidor	Temperatura justificada por la información detallada (**) o, si se desconoce, **10ºC**	Duración justificada por la información detallada	Si se desconoce, 1/3 VU	Si se desconoce, ½ (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.

Criterios de validación:

- El OEA que, basándose en modelos predictivos sobre límites de crecimiento/no crecimiento microbiano, demuestre que su producto no permite el crecimiento de *Lm*, con **probabilidad de crecimiento menor del 10%,** podrá demostrar que el alimento que elabora pertenece a la **categoría 1.3** y acogerse a no superar el límite de 100 ufc/g durante su vida útil, sin necesidad de estudios adicionales.
- Si el OEA puede justificar mediante el empleo de modelos de microbiología predictiva que la vida útil declarada garantiza que **no se superarán las 100 ufc/g**, se considerará que el estudio de vida útil es correcto y podrá incluir el ALC en la **categoría 1.2** y aplicar el criterio de 100 ufc/g durante la vida útil.
- Si el OEA **no ha podido demostrar mediante la microbiología predictiva que la vida útil asignada es segura**, o si no se han tenido en cuenta las consideraciones recogidas en este apartado para la simulación de microbiología predictiva, **deberá presentar otro tipo de estudios complementarios que permitan justificar el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.** Hasta que presente dichos estudios, deberá **aplicar el criterio de no detección en 25g durante la vida útil del alimento (1.2b) o establecer una vida útil inferior a 5 días (criterio 1.3).**

Ver ejemplos 6 (queso *cottage*) y 8 (jamón cocido) del anexo III.

5.3.3 Ensayos de desafío (*challenge test*)

Los ensayos de desafío permiten **validar** la vida útil de un alimento listo para el consumo bajo unas condiciones de almacenamiento determinadas, dando información sobre **el comportamiento de *Lm* (crecimiento, supervivencia o disminución) cuando se inocula de manera controlada en el alimento.**

Estos estudios deben tener en cuenta la variabilidad del producto (intra e interlote), así como la variabilidad asociada a las cepas inoculadas y al propio procedimiento de inoculación. Por ello, resulta esencial que el diseño experimental sea representativo del producto y de sus condiciones razonablemente previsibles de fabricación, distribución, almacenamiento y uso.

Los ensayos de desafío pueden realizarse con **dos objetivos** diferentes: valorar el **potencial de crecimiento** (es decir, la capacidad de *Lm* para crecer en el alimento y cuantificar la magnitud logarítmica del incremento), o bien estimar parámetros de este crecimiento (p.ej., **velocidad máxima de crecimiento**).

Antes de iniciar un ensayo de desafío, la empresa deberá facilitar al laboratorio **información relevante** sobre el producto a estudiar, así como del proceso de producción, la formulación, el envasado, las condiciones de conservación, la vida útil propuesta y otros factores que puedan influir en el comportamiento de Lm. Esta información permitirá identificar los factores que pueden tener un impacto en el crecimiento de *Lm* para priorizar su medición y demostrar que los productos analizados durante los ensayos son representativos de la producción habitual.

Para llevar a cabo un ensayo de desafío, el OEA deberá aportar al laboratorio la información a la que se hace referencia en los apartados 4 (Consideración de

Alimentos Listos para el Consumo e información al consumidor) y 5 (Caracterización de ALC en función del riesgo de crecimiento de *Lm)* de este documento.

Los detalles relacionados con la metodología para realizar un ensayo de desafío para evaluar el crecimiento de *Lm* están disponibles en la norma EN ISO 20976-1 y se especifican más detalladamente en la **Guía Técnica del EURL Lm (EURL *Lm*, 2021).**

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

- **Variabilidad intralote (mínimo 5 valores) e interlote (mínimo de 3 lotes diferentes)** y la derivada de la inoculación artificial de las unidades de ensayo
- Medición de **características fisicoquímicas relevantes**: Las características fisicoquímicas mínimas que deben conocerse antes de iniciar un ensayo de desafío son el **pH y la a_w.** Además, deben medirse otros factores como los **ácidos orgánicos**, en la medida en que sean relevantes para controlar el crecimiento de *Lm* en el producto. También pueden considerarse los **microorganismos autóctonos**, como los recuentos de aerobios mesófilos, bacterias ácido-lácticas, *Pseudomonas spp.*, levaduras y mohos.
- **Número de lotes y elección de estos**
- **Elección de cepa(s)**, que debe estar descrita y justificada. Todas las cepas deben **caracterizarse a nivel bioquímico y/o serológico y/o genético**, siendo preferible el uso de cepas previamente aisladas de matrices alimentarias, del entorno de producción o a partir de muestras clínicas, alimentarias o ambientales[1].
- **Preparación del inóculo** (concentración objetivo próxima a 100 ufc/g (siempre en un rango entre 50-200 ufc/g)
- **Preparación e inoculación de las unidades de ensayo**
- **Condiciones de conservación** aplicadas durante el ensayo, que deben reproducir las condiciones previsibles a lo largo de la cadena alimentaria (desde la fabricación hasta el consumo)
- **Análisis microbiológicos realizados**
- **Cálculos** (del potencial de crecimiento o de la velocidad máxima de crecimiento según el tipo de estudio)
- Extrapolación de los resultados e informe del ensayo

La inoculación de las unidades de ensayo es un paso crítico en la ejecución del ensayo. Debe realizarse a la **mayor brevedad posible tras la producción** del lote, es decir, en un plazo de **2 días**. Si existe un retraso en el transporte o si el producto tiene una vida útil larga (> 6 semanas), este tiempo podrá ser superior a 2 días y se debe justificar que no afecta a la estructura, a las características fisicoquímicas y a la flora microbiana del producto.

[1] De acuerdo con el documento de orientación técnica del EURL Lm ANSES sobre ensayos de vida útil de alimentos listos para el consumo, se recomienda utilizar un conjunto de cepas para realizar estos ensayos de desafío. Estas cepas son idóneas porque están caracterizadas para este uso específicamente, ya que se ha definido su capacidad de crecimiento y se ha determinado la µmax en condiciones rigurosas de pH, actividad de agua y temperatura. Además, se han aislado en diferentes matrices (carne, productos lácteos, productos del mar, muestras ambientales y vegetales) y distintos serotipos moleculares, lo que permite adecuar los estudios a las matrices objeto de ensayo. El conjunto de cepas del EURL Lm están disponibles en el LNR para Lm CNA y pueden ser suministradas previa solicitud.

Además, el proceso de inoculación de *Lm* debe garantizar que se distribuye de forma homogénea en el alimento. Para ello, deberá comprobarse la dispersión de los recuentos obtenidos en las muestras analizadas en t0. En particular, la **desviación estándar** de los **recuentos** de *Lm* obtenidos en las **3 muestras analizadas en t0** debe ser **< 0,3 log ufc/g**. Una desviación superior puede indicar una distribución no homogénea del inóculo y comprometer la validez del ensayo.

5.3.3.1 Ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento (Δ)

Un ensayo de desafío para evaluar el potencial de crecimiento (Δ) es un **estudio laboratorial que cuantifica el crecimiento de *Lm* en un alimento contaminado artificialmente, conservado en las condiciones previsibles de transporte, distribución y almacenamiento**.

El ensayo debe reflejar las **condiciones previsibles de almacenamiento** a lo largo de la cadena de distribución, desde la producción hasta el consumo. El periodo de ensayo comienza el día en que tiene lugar la contaminación artificial del producto y finaliza al final de la vida útil.

El potencial de crecimiento (Δ) es la diferencia entre la mayor concentración de *Lm* que se haya observado a lo largo del ensayo y la concentración inicial de *Lm* al principio de este (expresada en logaritmo en base 10 (log ufc/g)).

Durante el ensayo de desafío, se realiza el recuento de *Lm* el día de la contaminación y al final de la vida útil, con puntos de muestreo intermedios distribuidos a lo largo de la vida útil. La selección de estos puntos debe permitir detectar el posible crecimiento de *Lm* y determinar la concentración máxima alcanzada durante el período estudiado.

El potencial de crecimiento depende de muchos factores, entre los cuales se encuentran:

- La **temperatura**, siendo uno de los factores que más influyen sobre el crecimiento de *Lm.*
- La(s) **cepa(s) inoculada(s**). El ensayo debe hacerse con una **mezcla de cepas** de *Lm* y se deben utilizar **las mismas cepas en los 3 lotes**.
- El **estado fisiológico de las cepas inoculadas**: será necesario que las cepas inoculadas estén adaptadas para que su estado fisiológico sea similar al de las bacterias que podrían contaminar el producto en condiciones reales, teniendo en cuenta el peor de los casos (generalmente bien adaptadas). Así, por ejemplo, las bacterias que contaminan productos cárnicos cocidos, loncheados y envasados al vacío, procederán de un ambiente frío, y por tanto las cepas a inocular, deberán adaptarse a crecer en condiciones de baja temperatura.
- Las **propiedades intrínsecas del alimento** (p.ej., pH, contenido de NaCl, a_w, contenido nutricional, microbiota asociada, constituyentes antimicrobianos). Algunos de estos factores pueden variar dentro de un lote (variabilidad intra-lote) o entre lotes (variabilidad inter-lotes) y estas variabilidades deben abordarse antes de iniciar un ensayo de desafío.
- Las **propiedades extrínsecas** (p.ej., perfil tiempo/ temperatura, atmósfera).
- La preparación del inóculo y la inoculación de las unidades de ensayo. Las condiciones de conservación.

Las condiciones de conservación aplicadas durante el ensayo de desafío (incubación de las unidades de ensayo) deben cumplir con las condiciones a las que el producto probablemente estará expuesto en su uso normal hasta el final de la vida útil. Esto debe incluir el rango de temperaturas previsibles a lo largo de la cadena de frío: desde la producción hasta el comercio minorista, el almacenamiento en el punto de venta y el almacenamiento por parte del consumidor.

Es responsabilidad del OEA asegurarse de que las condiciones de almacenamiento utilizadas sean realistas, considerando que las temperaturas indicadas en el etiquetado pueden no mantenerse siempre a lo largo de la cadena de frío (desde la producción hasta el consumo).

Si se utiliza una temperatura de almacenamiento inapropiada (por ejemplo, más baja que la normalmente encontrada) durante el ensayo de desafío, puede producirse una **subestimación del crecimiento de *Lm*** y una **sobreestimación de la vida útil**.

La(s) temperatura(s) utilizadas para determinar la vida útil del producto deben estar **debidamente justificadas y documentadas** por el OEA.

Cuando se disponga de datos de temperatura (a nivel de fabricación, a nivel minorista y a nivel de consumidor), se recomienda utilizar esta información. En este caso, debe emplearse el **percentil 95** de los datos observados. Si no se dispone de datos sobre la temperatura y duración de la cadena de frío, debe utilizarse la temperatura por defecto indicada en la Tabla 4.

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

- Clasificar un alimento: Para el caso concreto de *Lm*:

$\Delta > 0{,}5 \log_{10}$	**ALC que puede favorecer el crecimiento de *Lm***, distinto de alimentos destinados a lactantes y a usos médicos especiales **(categoría 1.2).**
$\Delta \leq 0{,}5 \log_{10}$	**ALC que NO puede favorecer el crecimiento de *Lm***, distinto de alimentos destinados a lactantes y a usos médicos especiales (**categoría 1.3**).

- Cuantificar el crecimiento de *Lm* en un alimento de la categoría 1.2, de acuerdo con las condiciones definidas como razonablemente previsibles entre la producción y el consumo.
- Calcular la concentración máxima de *Lm* que puede estar presente al final del proceso de producción para cumplir con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.
- Establecer límites intermedios durante el proceso que deben ser lo suficientemente bajos como para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil (Figura 4).

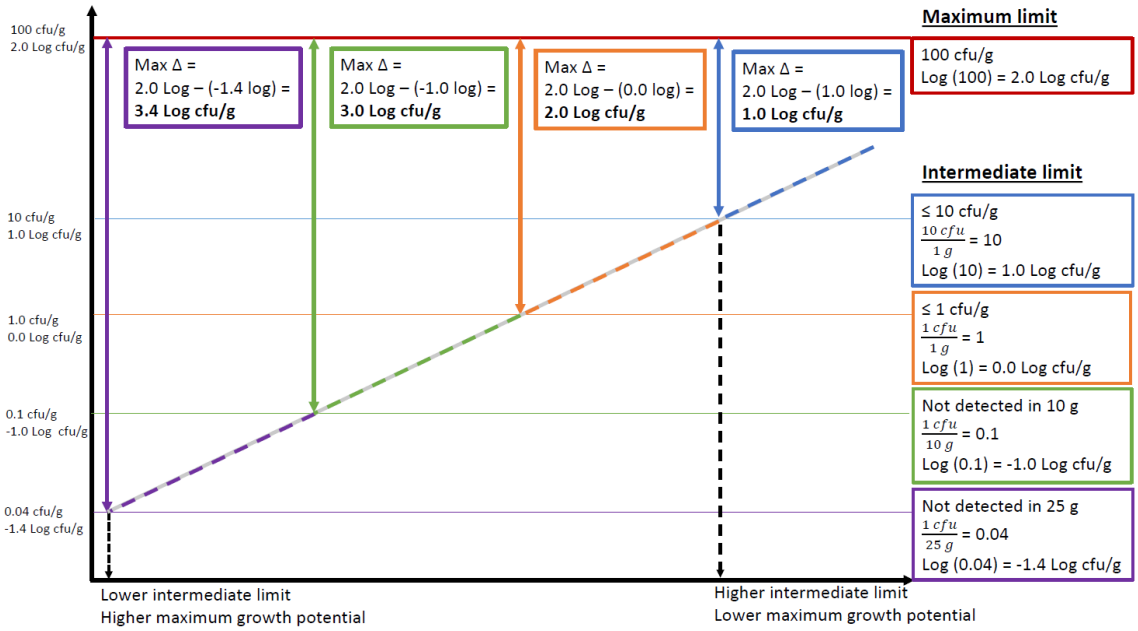


Figura 4. Relación entre el potencial de crecimiento y el posible límite intermedio. Fuente: Guía SANCO 11510/2013, revision of 18 December 2025.

Las **ventajas** principales de este método son su relativa facilidad de ejecución y que los resultados se pueden aplicar directamente para clasificar el alimento en la categoría 1.2 o en la categoría 1.3.

Su **inconveniente** es la falta de flexibilidad en la interpretación: **los resultados solo son válidos para el alimento estudiado en las condiciones especificadas**, por lo que hay que realizar nuevas pruebas cada vez que haya un cambio (p.ej., cambio de ingredientes o uso de diferentes perfiles tiempo/temperatura).

Ver ejemplos 7 (ensaladilla rusa) y 7 (jamón cocido) del anexo III.

5.3.3.2 Ensayos de desafío para evaluar la tasa específica máxima de crecimiento (μmax)

Es un **estudio laboratorial que mide la velocidad máxima de crecimiento de *Lm* en un alimento inoculado artificialmente, almacenado a una temperatura constante**.

Para obtener una estimación adecuada de μmax, es importante no realizar el estudio a temperaturas muy bajas y seleccionar una temperatura adecuada que permita observar toda la cinética de crecimiento de *Lm* a lo largo del tiempo. Con una estimación fiable de μmax, es posible simular condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles, incluyendo, por ejemplo, diferencias entre la temperatura durante el transporte, la distribución y el almacenamiento.

En este tipo de estudios y, a diferencia de los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento, se utiliza **una única cepa por ensayo**, 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.
Las condiciones de preparación del inóculo y de inoculación de las unidades de ensayo son idénticas a las descritas para los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento, con la salvedad de que la cepa se cultiva y utiliza individualmente, y la inoculación se lleva a cabo con una única cepa y no con una mezcla de cepas para cada curva de crecimiento.

El ensayo de desafío se realiza a una temperatura constante, que debe oscilar entre los 6 y los 10 ºC. En el caso de productos que contengan bacterias ácido-lácticas, la temperatura no debe superar los 8 ºC, para evitar que se inhiba el crecimiento del patógeno por las bacterias ácido-lácticas a temperaturas más elevadas.
Durante el ensayo, se realiza el recuento de *Lm* en puntos de muestreo distribuidos a lo largo de todas las fases de crecimiento. La duración del experimento debe ser suficiente para observar toda la curva de crecimiento de *Lm*, y este tiempo puede ser mayor o menor que la vida útil estudiada.

Los detalles relacionados con la metodología para realizar un ensayo de desafío para determinar la velocidad máxima de crecimiento se especifican en la Guía Técnica del EURL Lm (EURL Lm, 2021).

Una vez realizada la prueba, la tasa específica máxima de crecimiento (**μmax**) de la cepa de *Lm* a la temperatura estudiada se calcula a partir de la curva de crecimiento. En la fase de crecimiento exponencial, al representar el logaritmo natural (o neperiano) del número de células frente al tiempo, se obtiene una línea recta. La pendiente de esta línea es la **μmax**. Si la concentración se expresa en $\log_{10}$ en función del tiempo, se obtiene la velocidad máxima de crecimiento (**vmax)**.

En las publicaciones científicas y en algunas de las herramientas predictivas en microbiología, se suele hablar de **μmax**. Para evitar confusiones es esencial prestar atención a las unidades. La relación para pasar de un valor a otro es:
μmax= **Vmax** * Ln (10) = **Vmax** * 2,3.

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

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

Usando la siguiente ecuación, es posible extrapolar esta μmax a una temperatura para predecir otros valores μmax a distintas temperaturas en el mismo alimento:

$$\mu = \mu_{ref} \frac{(T - T_{\min})^2}{(T_{ref} - T_{\min})^2}$$

Los ensayos de desafío para calcular la velocidad máxima de crecimiento permiten:

- Estimar la concentración de *Lm* en un día determinado de la vida útil, si se conoce la concentración inicial.
- Estimar la máxima concentración permisible de *Lm* en un alimento que puede estar presente al final de la producción, con el fin de cumplir con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil (es decir, fijar límites intermedios).

La **ventaja** de este tipo de ensayos 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 *Lm.*

El inconveniente es que no está diseñado para determinar la fase de latencia, lo que puede conducir a una concentración de *Lm* estimada diferente, dependiendo de si se tiene en cuenta o no.

6. Estudios complementarios para verificar la vida útil

Una vez establecida y validada la vida útil de un ALC, es fundamental llevar a cabo actividades de verificación que respalden dicha determinación. Estas acciones permiten confirmar que, bajo las condiciones previstas de almacenamiento, distribución y uso, la presencia y el crecimiento de *Lm* se mantienen dentro de los límites de seguridad establecidos durante todo el periodo de vida útil. La verificación puede incluir análisis de lotes representativos al final de la vida útil o ensayos de durabilidad, entre otros controles.

6.1 Estudios de durabilidad

Los estudios de durabilidad permiten evaluar el crecimiento de *Lm* en un alimento **contaminado de forma natural** en condiciones razonablemente previsibles de tiempo y temperatura durante el transporte, la distribución y el almacenamiento por el consumidor final.

El objetivo de los estudios de durabilidad es **verificar** que los ALC contaminados de forma natural con *Lm* no superan el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

Los estudios de durabilidad pueden considerarse más realistas que las pruebas de inoculación para los alimentos individuales, ya que se trata de una contaminación presente de forma natural. Cuando se realizan en el marco de los autocontroles, son útiles para verificar la seguridad del alimento.

Los estudios de durabilidad **no son útiles por sí mismos para validar la vida útil de un alimento listo para el consumo** respecto a *Lm* debido a:

- Si en el alimento contaminado de forma natural la distribución de los microorganismos es heterogénea, no se puede cuantificar con precisión la evolución (positiva o negativa) de su número. La comparación de los recuentos obtenidos al principio y al final de la vida del alimento solo permiten una aproximación global a la evolución de las poblaciones en el curso de la duración de la vida útil. Esta limitación puede compensarse mediante la acumulación de resultados.
- Si el porcentaje de productos contaminados de forma natural por el microorganismo de interés es escaso, o si el nivel de contaminación inicial es

escaso en la gran mayoría de los productos, sería necesario un gran número de muestras (quizás un número irrealizable) para obtener una información utilizable.

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

a) **Para verificar la vida útil establecida de ALC que favorezcan el crecimiento de *Lm*, y que suelan estar contaminados con niveles bajos del patógeno.**

Este caso se da cuando una empresa alimentaria ya ha validado la vida útil de los alimentos listos para el consumo que favorecen el crecimiento de *Lm.* La empresa alimentaria es plenamente consciente del potencial de crecimiento de *Lm* en el producto, basándose en el bajo nivel de *Lm* al final de la producción (contaminación inicial), respaldado por los datos de la empresa alimentaria (datos históricos). En este caso, el estudio de durabilidad puede utilizarse para verificar si el alimento listo para el consumo cumple el límite de 100 ufc/g de *Lm* al final de la vida útil.

b) **Para evaluar el crecimiento de *Lm* si se detecta una contaminación inesperada en un ALC mientras esté bajo control del OEA**.

Si se detecta inesperadamente una contaminación mientras el ALC aún se encuentra bajo el control del OEA, este podría aprovechar la oportunidad para realizar un estudio de durabilidad con el fin de evaluar el crecimiento de *Lm* en este alimento contaminado de forma natural. Este escenario real podría aportar información adicional sobre el crecimiento de *Lm* en y la vida útil, tal y como se ha validado previamente como parte del SGSA. No obstante, es complejo, al detectar un alimento contaminado con *Lm*, emprender las actuaciones necesarias para llevar a cabo un ensayo de durabilidad riguroso, por lo que difícilmente se podrá dar esta situación en la práctica.

Para poder interpretar los resultados del estudio, se deben tomar tantas muestras como sea posible del lote contaminado, a fin de aumentar las posibilidades de seleccionar una unidad contaminada.

Los detalles relacionados con la metodología para realizar un estudio de durabilidad se especifican en la Guía Técnica del EURL Lm (EURL Lm, 2021).

Interpretación de los resultados de los estudios de durabilidad y medidas recomendadas

En los estudios de durabilidad realizados con el mismo tipo de producto, fabricado con el mismo proceso y en las mismas condiciones, la proporción estimada prevista de unidades que podrían superar el límite de 100 ufc/g a lo largo de la vida útil puede calcularse con un determinado nivel de confianza (por ejemplo, el 95 %) utilizando la herramienta que se proporciona en el punto 7.2.5. de la Guía Técnica del EURL Lm (EURL Lm, 2021) o la de Bioqura (T101:IC proporción positivos). El resultado se expresa como un intervalo de confianza. Cuanto mayor sea el número de unidades de muestra analizadas, mayor será la probabilidad de seleccionar una muestra no conforme y, por lo tanto, más estrecho será el intervalo de confianza. Si una empresa alimentaria es capaz de recopilar un conjunto sustancial de resultados de estudios de durabilidad, todos ellos conformes con el límite de 100 ufc/g, estos datos reforzarán la

confianza en que el SGSA funciona correctamente y que la vida útil relacionada con *Lm* se estableció y validó inicialmente de forma correcta. Sin embargo, incluso si todos los resultados son conformes, sigue habiendo una proporción de unidades que podrían no ser conformes, como muestra la calculadora. Por lo tanto, los **estudios de durabilidad no deben utilizarse como herramienta independiente para la validación de la vida útil** de un alimento listo para el consumo en relación con *Lm*.

En caso de que los resultados de las muestras analizadas durante los estudios de durabilidad **no** sean **conformes** (es decir, se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil), esto significa que el **SGSA está fuera de control**. Cuando esto ocurre, es crucial para la salud pública que se evalúen los riesgos y se investiguen a fondo y de manera oportuna las consecuencias de haber superado el límite de *Lm* de 100 ufc/g en el ALC a lo largo de su vida útil. Esto debería dar lugar al seguimiento y la detección de la fuente que ha dado lugar al incumplimiento y a su mitigación. Se recomienda a la empresa alimentaria que lleve a cabo una investigación exhaustiva para identificar la causa-raíz de la contaminación. En este caso, sería necesario revisar el SGSA, por ejemplo, la selección de materias primas, el programa de vigilancia ambiental de *Lm*, la modificación del proceso de producción, la adaptación de la formulación del producto o el establecimiento y la validación de una vida útil más corta. Los resultados no conformes también podrían ser un indicio de variabilidad en el proceso de producción, lo que significa que no se evaluó adecuadamente el peor de los casos al establecer y validar la vida útil inicial relacionada con *Lm*.

7. Cómo combinar los datos generados por los estudios complementarios para determinar la vida útil en relación con *Lm* e integrarlos en el SGSA

Los estudios descritos anteriormente (microbiología predictiva, ensayos de desafío, estudios de durabilidad) contribuyen a un objetivo común: garantizar que los alimentos que se ponen en el mercado sean seguros y cumplan con los criterios microbiológicos establecidos en el Reglamento (CE) n.º 2073/2005. La razón principal para combinar los datos generados por estos estudios es evaluar la información de manera conjunta para asegurar que la concentración de *Lm* se mantenga por debajo de 100 ufc/g durante toda la vida útil del producto alimenticio.

Los estudios complementarios constituyen un conjunto de recursos útiles en las tres fases: establecimiento, validación y verificación de la vida útil, tal como se ilustra en la Figura 5.

7.1 Establecimiento de la vida útil

Para un nuevo producto alimenticio, hay información que puede servir como herramienta de cribado para **establecer** la vida útil, p.ej., la comparación con la vida útil asignada a productos similares de otros fabricantes y los estudios bibliográficos disponibles sobre productos semejantes. No obstante, aunque se utilice esta información para establecer inicialmente la vida útil, **es insuficiente para validarla**. En última instancia, **es responsabilidad de cada OEA determinar y validar la vida útil de sus propios productos.**

7.2 Validación de la vida útil

Una vez establecida la vida útil, el siguiente paso es **validarla**. Para ello son necesarios modelos predictivos basados en las condiciones físicas o ensayos de desafío.

Utilizar modelos predictivos o ensayos de desafío para validar la vida útil del producto alimenticio puede ayudar a **identificar los parámetros que limitan el crecimiento de *Lm***. Entre dichos parámetros se encuentran la temperatura, el pH, la a_w, la presencia de aditivos como conservantes y la microbiota.

Por ejemplo, si se determina que el pH es el factor crítico que inhibe el crecimiento, incluso un ligero aumento del pH debido a pequeñas desviaciones en el proceso de producción podría favorecer un mayor crecimiento de *Lm*. Esto podría llevar a que el OEA establezca una vida útil demasiado larga, permitiendo que se supere el límite de 100 ufc/g de *Lm* durante dicho periodo. Por ello, es importante tener en cuenta el peor escenario posible al utilizar ciertos datos para establecer la vida útil del producto. En este ejemplo, para evitar errores potenciales, las mediciones de pH podrían incluirse en el plan APPCC como un Punto Crítico de Control (PCC).

En consecuencia, **la validación de la vida útil y el plan APPCC son herramientas interconectadas que deben funcionar de manera conjunta**

7.3 Verificación de la vida útil

Una vez validada la vida útil, es esencial **verificar el proceso** mediante la monitorización de la presencia de *Lm* en el entorno y el análisis regular de los productos alimenticios para comprobar si el patógeno está presente (y en qué concentración) al final de la producción y hasta el final de su vida útil. **Dicho muestreo no puede abarcar todo el lote y, por tanto, no puede sustituir a los métodos de validación utilizados para determinar la vida útil**. En consecuencia, el propósito del muestreo es asegurar que se mantienen las condiciones establecidas para la vida útil del producto.

Los registros obtenidos en el histórico de datos de la empresa o los obtenidos en estudios de durabilidad se pueden emplear para verifica la vida útil del alimento.

7.3.1 Histórico de datos

El histórico de datos es un componente esencial de los registros que una empresa alimentaria conserva como parte de sus operaciones habituales. Algunos de estos datos serán registrados por la empresa alimentaria como parte de sus obligaciones legales, tales como los registros de trazabilidad y los registros de verificación, los cuales permiten demostrar que el SGSA funciona correctamente para garantizar la producción de alimentos seguros. El histórico de datos desempeña un papel importante en la **verificación** de la vida útil de los alimentos listos para el consumo en lo que respecta a la *Lm*, ya que ofrece información valiosa sobre su comportamiento en el producto en condiciones reales de producción y almacenamiento. Esta información ayuda a garantizar que los criterios de seguridad establecidos durante el proceso de validación se mantengan de forma coherente. Sin embargo, el histórico de datos puede presentar una variabilidad significativa en factores como las fluctuaciones de temperatura, las prácticas de manipulación, las condiciones de almacenamiento y el tamaño de las muestras. Esta variabilidad hace que el **histórico de datos no sea adecuado para validar la vida útil.** A continuación, se presenta una lista no exhaustiva de posibles fuentes de datos:

- Certificados de análisis de ingredientes aportados por los proveedores;
- Controles rutinarios de verificación realizados regularmente por el OEA (por ejemplo, temperaturas, pH, a_w, etc.);
- Análisis microbiológicos de los ingredientes suministrados;
- Análisis microbiológicos del producto a lo largo de su vida útil;
- Análisis microbiológicos del agua y muestras ambientales;
- Registros de procedimientos de limpieza y desinfección;
- Registros de reclamaciones;
- Registros de retiradas y recuperaciones de productos;
- Registros de controles oficiales.

Ejemplos de situaciones en las que el histórico de datos puede ser útil para **verificar** que la vida útil previamente validada es correcta.

- Cuando los niveles de *Lm* en ALC al final de la vida útil son consistentemente bajos o no detectables y no se han obtenido resultados que superen los límites legales establecidos en el Reglamento (CE) n.º 2073/2005. Estos datos pueden utilizarse junto con datos de muestreo ambiental y calidad de ingredientes para dar confianza al OEA de que dichos ALC no supondrán un riesgo para la salud pública. El nivel de confianza aumenta con la cantidad de datos disponibles. Cuantas más unidades de producto se analicen, más fiables serán los datos históricos (EURL *Lm*, 2021).
- Los datos históricos sobre los niveles de *Lm* en ALC al inicio y al final de la vida útil pueden utilizarse para ayudar a verificar la vida útil del **producto bajo condiciones razonablemente previsibles de procesamiento, almacenamiento, distribución y uso**.
- Los datos históricos sobre los niveles de *Lm* en ALC al inicio y al final de la vida útil bajo condiciones razonablemente previsibles también pueden utilizarse para verificar la posibilidad de crecimiento en ALC similares con características comparables (pH, a_w, microbiota, etc.) producidos en condiciones prácticamente idénticas.
- También es importante recopilar datos históricos para comprender la posible variabilidad interlote e intralote de los parámetros críticos que controlan el crecimiento de *Lm.*

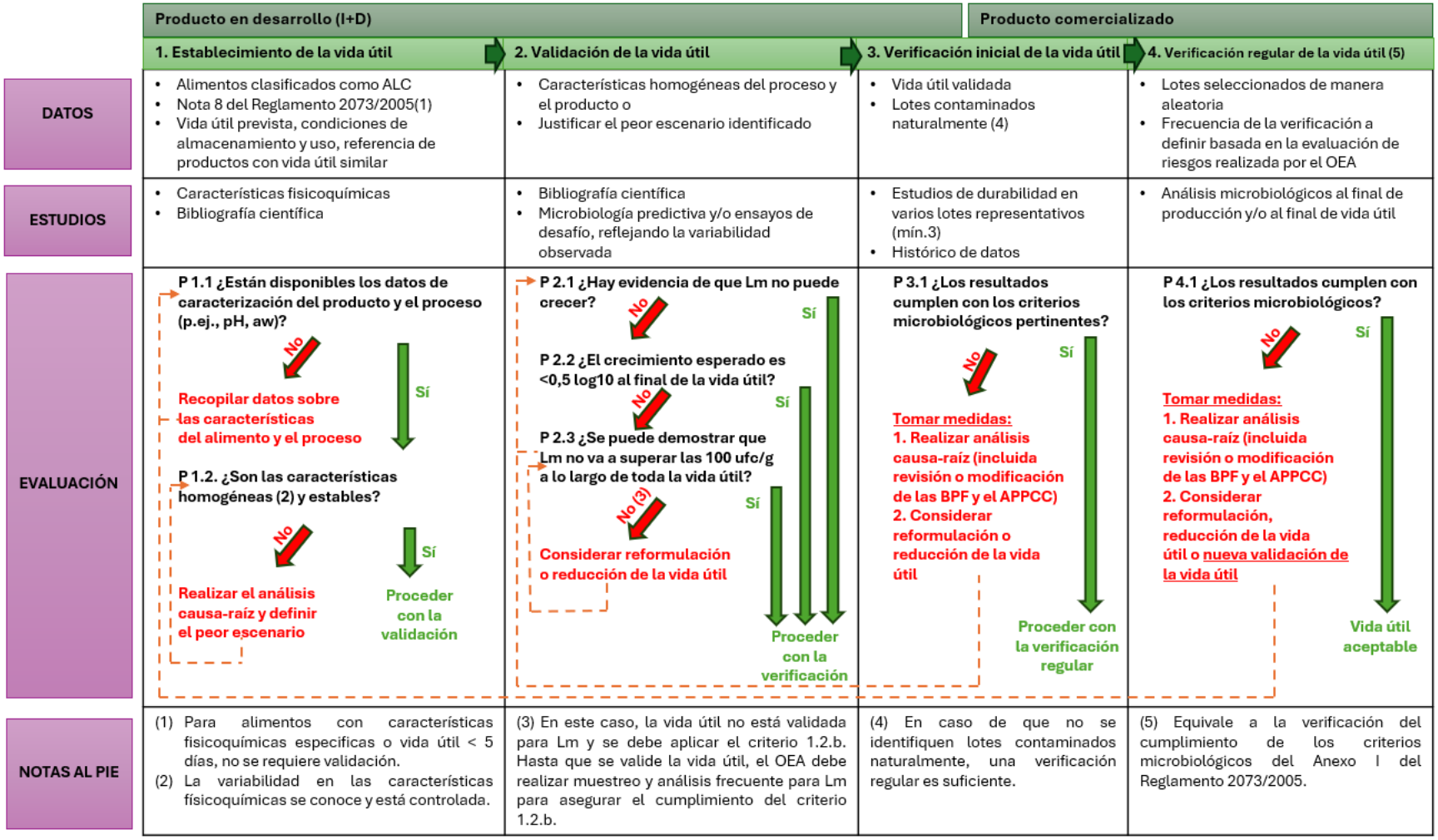


Figura 5. Diagrama de flujo para mostrar cómo el OEA puede combinar toda la información recopilada para validar y verificar la vida útil de los ALC en lo que respecta a Lm. Fuente: Guía SANCO 11510/2013, revision of 18 December 2025.

8. Alimentos que se comercializan con límite no detección en 25 g hasta el final de su vida útil.

Cuando un OEA que comercializa ALC que favorecen el crecimiento de *Lm* no dispone de estudios de vida útil que justifiquen, a satisfacción de la autoridad competente, que el alimento no superará las 100 ufc/g durante su vida útil, ya sea porque aún no ha llevado a cabo los estudios necesarios o porque los estudios presentados no se consideran suficientes, puede comercializar alimentos aplicando el criterio 1.2.b).

Puesto que el establecimiento de una vida útil sin validar no se puede considerar una medida de control adecuada para garantizar que la presencia de *Lm* está bajo control, la aplicación del criterio de no detección de *Lm* durante la vida útil se debe acompañar de medidas de verificación extensiva que aporten confianza en el SGSA del OEA. En este caso, el **muestreo y análisis debe ser más frecuente** que en la verificación rutinaria de una vida útil validada. Se deberán realizar análisis microbiológicos para la detección de *Lm* al **final de la producción y al final de la vida útil**. La aplicación de una frecuencia de muestreo que aporte garantías de representatividad de la verificación será definida en base al riesgo, teniendo en cuenta la posibilidad de que los OEA deben aplicar varias medidas para el control de la contaminación y del crecimiento de *Lm* en el alimento en condiciones razonables de distribución, almacenamiento y uso.

Para el control efectivo de *Lm* los OEA pueden utilizar diferentes estrategias según el ALC que producen, aplicando medidas de control que actúan sobre factores identificados que pueden influir en la contaminación y el crecimiento de *Lm* en condiciones razonables de distribución, almacenamiento y uso del ALC, como por ejemplo: la aplicación de etapas de letalidad que eliminan el patógeno en el procesado, vigilando el grado de contaminación en las zonas y superficies de los equipos, con especial atención a etapas de procesado post letal aplicadas en el envase final, la presencia de agentes inhibidores del crecimiento de *Lm* en alimento final, las condiciones de envasado para su comercialización, etc.

Se desarrollarán orientaciones sobre las frecuencias de muestreo en un documento complementario[4].

En estos casos en los que no se ha validado la vida útil es fundamental contar con un **plan de vigilancia ambiental sólido**, que incluya la toma de muestras de **superficies en contacto (SC)** para la verificación del control de la contaminación directa de los ALC procesados y de **superficies de no contacto** (**SNC)** para el control de la contaminación cruzada en número y frecuencia adecuados.

Se debe considerar también que los **establecimientos que producen ALC que favorecen el crecimiento de *Lm* y que no han presentado estudios satisfactorios para validar su vida útil** son considerados por la AC como **establecimientos de mayor riesgo**, lo que se tiene en cuenta en la programación de los controles oficiales, de conformidad con el Documento de orientación para la clasificación de los establecimientos alimentarios en función del riesgo en el marco del PNCOCA 2026-2030.

[4] Existen documentos de autoridades competentes de otros países que pueden servir de orientación. Control measures for Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods

9. Verificación de los estudios de vida útil por parte del control oficial

El artículo 17, apartado 2, del Reglamento (CE) n.º 178/2002 establece la obligación general de las autoridades competentes de los Estados Miembros de supervisar y controlar que los requisitos de la legislación alimentaria se hayan aplicado de manera exhaustiva y eficaz en todas las etapas de la cadena alimentaria. Esto incluye verificar que se cumplan, a satisfacción de la autoridad competente, todos los requisitos legales relativos al establecimiento y la validación de la duración de la vida útil de los productos alimenticios.

Durante los controles oficiales, las autoridades competentes deben evaluar los estudios realizados bajo la responsabilidad del OEA y, más concretamente:

- Si el producto ha sido clasificado correctamente por el OEA (listo para el consumo o no listo para el consumo).
- Si el operador ha realizado adecuadamente la caracterización del producto (incluyendo las posibles variabilidades intra e inter lote).
- Si el producto está correctamente categorizado (favorece o no favorece el crecimiento de *Lm*).
- Si se ha validado adecuadamente la vida útil en relación con *Lm* (con justificación de la elección del tipo de estudio), incluido el cumplimiento del límite que le aplica con respecto a *Lm* según la categoría de ALC.
- Si la empresa alimentaria documenta las medidas y acciones correctivas adecuadas en su SGSA tras la identificación de incumplimientos (incluido el control ambiental).

El resultado de la verificación oficial se expresará según la estrategia de validación utilizada por el OEA:

9.1 Valoración oficial de los estudios desarrollados por las propias empresas:

En este caso, el estudio de vida útil que va a verificar el control oficial, lo ha realizado íntegramente el fabricante responsable del producto. El resultado de la verificación se podrá considerar:

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

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

9.2 Valoración de los estudios desarrollados por otras empresas o asociaciones.

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

- Sucursales de la misma empresa
- Asociaciones sectoriales
- Grupos empresariales
- Franquicias
- Obradores de cadenas alimentarias
- Cadenas de supermercados

En este caso la empresa debe ser capaz de demostrar a la autoridad competente que los productos y los procesos de producción son similares, o, si los productos no son similares, demostrar cuales son las diferencias y qué efectos tienen sobre la supervivencia y el crecimiento de *Lm*. La empresa puede emplear la bibliografía científica disponible y datos de investigación como referencia.

En estas circunstancias, el control oficial no tendrá que verificar el estudio de vida útil en sí mismo si el OEA demuestra que ha sido ya verificado por otra autoridad competente. En este caso lo que tendrá que verificar es que la documentación que presente el OEA evidencie la equivalencia de productos y procesos. Para ello verificará los aspectos mencionados con anterioridad.

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

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

ANEXO I- Base legal y documentación de referencia

- Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

- Reglamento (CE) n° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.

- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15, de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

- Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011 , sobre la información alimentaria facilitada al consumidor

- Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.° 999/2001, (CE) n.° 396/2005, (CE) n.° 1069/2009, (CE) n.° 1107/2009, (UE) n.° 1151/2012, (UE) n.° 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.° 1/2005 y (CE) n.° 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n.° 854/2004 y (CE) n.° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales).

- Reglamento de Ejecución (UE) 2019/627 de la Comisión, de 15 de marzo 2019, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se modifica el Reglamento (CE) n.° 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales.

- Reglamento (UE) 2024/2895 de la Comisión, de 20 de noviembre de 2024, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 en lo que respecta a *Listeria monocytogenes.*

- Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos

- Real Decreto 1086/2020, de 9 de diciembre, por el que se regulan y flexibilizan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones de la Unión Europea en materia de higiene de la producción y comercialización de los

productos alimenticios y se regulan actividades excluidas de su ámbito de aplicación.

- Documento de preguntas y respuestas sobre el RD 562/2025, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados sobre la cadena alimentaria y operaciones relacionadas.

- Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2026-2030. AESAN.

- Directrices para la verificación del muestreo de *Lm* en zonas de trabajo y equipos utilizados en la producción de alimentos listos para el consumo. AESAN, 2020

- Guía de estudios de vida útil para Lm en alimentos listos para el consumo. Comunidad de Madrid. Tercera edición: noviembre 2023.

- Los estudios de vida útil segura de alimentos listos para el consumo. Agencia de Salud Pública de Barcelona, 2025. Bover, S. Jofré, A. Portaña, S, Vila, M.

- Guía para la realización de los estudios de vida útil en relación con Lm, conforme al Reglamento (CE) nº 2073/2005 (SANCO 11510/2013, revision of 18 December 2025).

- Comunicación de la Comisión sobre la aplicación de sistemas de gestión de la seguridad alimentaria que contemplan buenas prácticas de higiene y procedimientos basados en los principios del APPCC, especialmente la facilitación/flexibilidad respecto de su aplicación en determinadas empresas alimentarias (2022/C 355/01)

- Documento de Orientación del EURL-*Lm* para evaluar la competencia de los laboratorios en la aplicación de pruebas de desafío y estudios de durabilidad, en relación con *Lm*, en alimentos listos para el consumo.

- Traducción oficiosa del Documento de orientación técnica del EURL-Lm sobre ensayos de desafío y estudios de durabilidad para evaluar la vida útil de alimentos listos para el consumo en relación con la Lm (Versión 4 del 1 de julio de 2021, enmienda 1 del 26 de febrero de 2026).

- Opinión científica sobre la persistencia de peligros microbiológicos en entornos de procesado de alimentos. EFSA Journal, 2024. DOI: 10.2903/j.efsa.2024.8521

- Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para Lm en determinados productos alimenticios (Nº de referencia: AESAN-2011-003)

- Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la verificación de estudios de vida útil en relación a Lm en alimentos listos para el consumo (Nº de referencia: AESAN-2019-001)

- Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la clasificación de los establecimientos alimentarios en base al riesgo en el marco del Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA) 2021-2025 (Nº de referencia: AESAN-2021-010).

- Directrices para la validación de medidas de control de la inocuidad de los alimentos (CAC/GL 69-2008). Codex Alimentarius (FAO/OMS), 2008.

- Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos (CAC/GL 61 – 2007). Codex Alimentariuas (FAO/OMS), 2007.

- Principios generales de higiene de los alimentos (CXC 1-1969). Codex Alimentarius (FAO/OMS), 2023.

- Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods. A Risk Managers Guide. Microbiological Risk Assessment Series, no 24. Rome. 120pp. FAO/OMS, 2016.

- Risk assessment of Listeria monocytogenes in foods: Part 2 – Risk assessment (Meeting report). Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA), 2025.

- Control measures for Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods Canadian Food Inspection Agency (CFIA), 2023.

- Policy on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods.Canadian Food Inspection Agency (CFIA), 2023.

- Compliance Guideline: Controlling Listeria monocytogenes in post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. USDA Food Safety and Inspection Service (FSIS), 2014.

- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche – DGAL (2009). Note de service DGAL/SDSSA/N2009-8004 du 6 janvier 2009 relative à la classification du fromage Roquefort au regard du critère Listeria monocytogenes.

ANEXO II – Listados de verificación

1. DEFINICIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
1.1 DEFINICIÓN DEL PRODUCTO				
Se describe de manera detallada el producto	Denominación comercial			
	Composición			
	Formato (peso, cantidad, grosor, calibre, etc.)			
	Presentación (entero, loncheado, etc.)			
	Envasado (al vacío, atmósferas modificadas, etc.)			
	Condiciones de fabricación, especialmente tratamientos térmicos, secado, ahumado, etc. para cada formato.			
	Modo y temperatura de conservación esperados			
	Vida útil indicada			
<u>Conclusión</u>: se ha descrito de manera detallada el producto (en todos los apartados se ha marcado SÍ).				
Observaciones:				
1.2 CONSIDERACIÓN DE ALC (ver Figura 1 del documento – Árbol de decisiones para el OEA)				
De acuerdo con las instrucciones de uso que figuren en el etiquetado está previsto que el alimento sufra un tratamiento listericida (que garantice una reducción de 6 logaritmos (D6)) antes de su consumo.				
El tratamiento térmico que se indica en el etiquetado está correctamente validado por el operador.				

El operador demuestra que el uso previsto (incluidas las sugerencias en forma de fotografías en el envasado u otros canales, p. ej. web, redes sociales, etc.) coincide con el uso razonablemente previsible, sin evidencias objetivas de que existan patrones de consumo alternativos extendidos entre los consumidores de la población de destino.			
El tratamiento térmico se indica de manera destacada en el etiquetado y es comprensible, realista y aplicable por el consumidor en un entorno doméstico.			
Conclusión: el operador puede justificar, con la descripción detallada del producto aportada que no es un alimento listo para el consumo.			
Observaciones:			

2. ALC QUE NO REQUIEREN PRUEBAS REGULARES PARA LA DETECCIÓN DE *Lm* EN CIRCUNSTANCIAS NORMALES. NOTA 4 REGLAMENTO (CE) 2073/2005	**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
¿El alimento pertenece a alguna de las siguientes categorías? - Los que hayan recibido un tratamiento listericida validado sin posibilidad de recontaminación (por ejemplo, tratamiento en su envase final) (ver apartado 5: reducciones logarítmicas) - Frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas - Pan, galletas y productos similares, - Aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares, - Azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate, - Moluscos bivalvos vivos - Sal de cocina			
Conclusión: El operador puede justificar que el ALC pertenece a las categorías de productos anteriores (no se			

exige realizar pruebas regulares con respecto al criterio 1.3).				
Observaciones:				
3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA DEL PRODUCTO.		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
La caracterización del producto incluye:	pH			
	a_w			
	Concentración de aditivos			
	Estructura (sólido, líquido)			
	Microbiota habitual			
	Compuestos fenólicos			
	Otros			
¿Se dispone de un mínimo de 15 datos de pH y /o de aw correspondientes a tres lotes diferentes (n= 5/ lote) representativos de la producción?				
Se caracteriza la variabilidad intra e inter-lote de pH y / o a_w, y se estima que la probabilidad de que el pH y/o la a_w sean superiores al límite establecido en la nota 8 es inferior al 5% (es decir, existe una confianza estadística superior al 95% de que el pH y/o la a_w es inferior al límite establecido).				

- **pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92** - **pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94**			
Para los alimentos multicomponente (por ejemplo, un sándwich) estos valores se han calculado para cada uno de los componentes separados del producto una vez montado, esperando el tiempo suficiente, que se habrá registrado, para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes. Se ha considerado el componente más favorable para el crecimiento microbiano. No se deben calcular a partir de una muestra homogeneizada del producto completo.			
Se caracterizan otros factores intrínsecos o extrínsecos empleados para justificar la vida útil establecida (p.ej., concentración de aditivos).			
La vida útil establecida es inferior a 5 días			
Conclusión: El alimento está correctamente caracterizado.			
Observaciones:			
Conclusión: El operador puede justificar que pertenece a la categoría 1.3 de productos que no pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes* por pH/a_w (nota 8 Reglamento (CE) 2073/2005).			
Observaciones:			

4. BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA. NOTA 8 REGLAMENTO (CE) 2073/2005	**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
El informe está avalado por expertos y, en caso de haberse hecho por terceros, esto se indica específicamente.			
El informe describe la metodología de búsqueda, esta se ha realizado usando bases de datos reconocidas (PubMed, Google Scholar, Web of Science, Scopus, etc.)			
La selección de artículos se ha realizado minimizando la presencia de sesgos (ver apartado 5.2).			
Están identificadas correctamente las características intrínsecas y extrínsecas del producto y se demuestra que el			

producto tiene las mismas características que los de la bibliografía científica aportada. En caso contrario, se ha evaluado el efecto de las diversas características en la supervivencia y el crecimiento de *Lm.*			
Se justifica que el proceso de producción es muy similar a los de la bibliografía científica aportada.			
Se justifica que las condiciones de conservación (tiempo, temperatura y envasado) cubren las condiciones razonablemente previsibles del producto objeto de estudio (ver tabla 4 del documento de orientación).			
¿La bibliografía científica recoge resultados obtenidos con diferentes cepas de *Listeria monocytogenes que* refuercen la validez y la aplicabilidad de dichos resultados para los fines del estudio?			
Conclusión: Puede justificar que pertenece a la categoría 1.3 de productos que no pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes.*			
Observaciones:			

5. ALC QUE PUEDEN FAVORECER EL CRECIMIENTO DE *L.m.* ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS			
5.1. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
El informe está avalado por expertos y, en caso de haberse hecho por terceros, esto se indica específicamente.			
El informe describe claramente el objetivo del estudio			
El informe parte de una caracterización adecuada del alimento (ver listado de verificación 1).			
Se indica la estrategia de búsqueda, criterios de selección y fuente de los modelos seleccionados (FSSP, Pathogen Modelling Programme, MicroHibro…).			
Se describe el modelo seleccionado.			

Se comprueba que el producto está dentro del rango de validez del modelo.				
Se describen las condiciones de la simulación	Se justifican los parámetros introducidos (pH, a_w, conservantes, etc.) (ver apartado 5.3.1 Selección del peor escenario posible)			
	Se justifica la concentración inicial de Lm introducida en el modelo (de manera general, un escenario conservador es partir de una concentración inicial de 1 ufc/g)			
	Se definen temperaturas de simulación, que cubren las condiciones razonablemente previsibles de conservación del producto objeto de estudio (tabla 4 del documento de orientación).			
	Se considera que la fase de latencia es cero (escenario conservador)			
El modelo ha sido validado con cepas diferentes a las que se utilizaron en su elaboración o ha sido elaborado utilizando un cóctel de cepas de *Listeria monocytogenes.*				
Se considera la variabilidad asociada a las diferencias de procesado, de las características del alimento y de las condiciones de almacenamiento.				
Presentación de resultados	Se presentan probabilidades de crecimiento.			
	Se presentan curvas de crecimiento			
	Se calcula el potencial de crecimiento			
	Se presentan gráficas comparativas por producto, en caso de incluirse varios productos en el estudio			

	Se clasifica el producto en función de si favorece o no el crecimiento de Lm			
Presentación de las conclusiones del informe	Indica las suposiciones y/o datos de partida sobre las que se basan las conclusiones			
	Indica los resultados de la simulación y cualquier otro dato, incluido bibliográfico, empleados en la sustentación de las conclusiones			
	La vida útil propuesta está justificada por los resultados.			
Conclusión:	**¿El estudio de microbiología predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran,** con **probabilidad de crecimiento menor del 10%, que el producto no favorece el crecimiento de *Lm***? En caso negativo, indicar motivos en observaciones			
	¿El estudio de microbiología predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil? En caso negativo, indicar motivos en observaciones			
Observaciones:				
5.2. ENSAYOS DE DESAFÍO		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
Se han realizado ensayos de desafío para valorar la capacidad de Lm para crecer en el alimento (potencial de crecimiento Δ). En caso de respuesta afirmativa, completar sección 5.2.1.				

Se han realizado ensayos de desafío para estimar los parámetros de crecimiento de Lm (tasa de crecimiento máximo, μmax). En caso de respuesta afirmativa, completar sección 5.2.2.			
El laboratorio que realiza el ensayo dispone de garantías adecuadas de competencia técnica (p. ej., acreditación EN ISO/IEC 17025, controles de calidad, participación satisfactoria en ensayos de aptitud)			
El informe indica expresamente que el ensayo se ha diseñado y ejecutado conforme a la guía técnica del EURL-Lm sobre ensayos de desafío.			
Se describe de forma completa el producto (características fisicoquímicas, denominación, composición, sistema de envasado, peso/formato, tipo de producto, vida útil prevista, modo de conservación, instrucciones de uso, fecha de fabricación, etc.)			
Se ha evaluado la variabilidad intralote (mínimo 5 valores) e interlote (mínimo de 3 lotes diferentes) de aquellos factores relevantes del producto (p.ej. pH y aw).			
Se describen las condiciones del proceso que puedan influir en el crecimiento de Lm (p. ej., tratamiento térmico, ahumado, secado, maduración, troceado, picado, salado, congelación, etc.)			
Se aporta información que demuestra que los lotes objeto de ensayo son representativos de la producción (al menos 3 lotes) y preferentemente representan el escenario menos favorable			
Está justificado que se utiliza un solo lote porque la repercusión de la variabilidad interlote de los parámetros fisicoquímicos (pH, aw) sobre el crecimiento de *Lm* no es relevante.			
5.2.1. ENSAYOS DE DESAFÍO PARA EVALUAR EL POTENCIAL DE CRECIMIENTO (Δ)	**SÍ**	**NO**	
Para evitar cambios físico-químicos en el producto, ¿Se ha realizado la inoculación dentro de los 2 días posteriores a su fabricación?			

En caso de haber transcurrido más de 2 días desde la fabricación hasta la inoculación, ¿se justifica conforme a la guía técnica del EURL-Lm?				
Se describe y justifica la elección de las cepas inoculadas (caracterizadas por origen y características de crecimiento)				
¿Los lotes se han inoculado con la misma mezcla de cepas?				
Se describe	la preparación del inóculo (subcultivos, condiciones, volumen total, etc.)			
	la concentración objetivo, siendo esta próxima a 100 ufc/g o ml (entre 50-200 ufc/g o ml) o, si se usa otra concentración, ¿se justifica técnicamente?			
La técnica de inoculación es adecuada al tipo de producto y al escenario realista de contaminación "natural" y se comprueba que no altera de forma relevante las propiedades del alimento. *Ej.: inoculación en "superficie" para reproducir contaminación cruzada desde superficie de cortadora; inoculación en "profundidad" para reproducir contaminación en productos sometidos a picado/amasado, etc.*				
¿El ensayo incluye también muestras de control (sin inocular) para ver la ocurrencia natural de *L. monocytogenes* en el producto?				
Se demuestra que la distribución del inóculo es homogénea en tiempo 0, de forma que la desviación estándar de las 3 unidades inoculadas es < 0,3 log ufc/g.				
Se ha inoculado y realizado recuento de Listeria en al menos 7 muestras por lote, 3* en tiempo 0 (tras inocular), 3 a lo largo de la vida útil y 1 al final? **Puede ser 1 si los 3 lotes se inoculan de manera simultánea.*				
Se ha realizado investigación de *Lm* en la muestra control obteniendo un resultado de no detección en 25 g (*si se detecta se puede seguir el ensayo siempre que*				

el recuento sea inferior al obtenido en las muestras inoculadas)				
Se han contemplado las condiciones razonablemente previsibles de:	Envasado (al vacío, atmósferas modificadas, etc.)			
	Temperaturas de almacenamiento en la industria (7ºC)			
	Temperaturas de almacenamiento en el comercio al por menor (7ºC)			
	Temperaturas de almacenamiento por el consumidor (10ºC)			
En caso contrario, ¿se han conservado reproduciendo las condiciones razonablemente previsibles aportadas por el operador, justificadas por información detallada, estableciendo las mismas en el percentil 95 de sus observaciones?				
¿Se han medido en las unidades de control los parámetros fisicoquímicos fundamentales del producto (al menos pH y aw) y se ha realizado control de temperatura y recuento de microbiota asociada?				
Los análisis de detección y recuento de Lm se han realizado utilizando los métodos de referencia (EN ISO 11290-1 y EN ISO 11290-2) o con métodos alternativos conforme al artículo 5 del Reglamento (CE) nº 2073/2005.				
Se incluyen los cálculos realizados para valorar el potencial de crecimiento y se interpretan correctamente: - **Δ > 0,5 log10** implica que el alimento **favorece el crecimiento de *Lm*** - **Δ ≤ 0,5 log10** implica que **no favorece el crecimiento de *Lm***				
<u>Conclusión:</u>	**¿El ensayo de desafío aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no favorece el**			

	crecimiento de *Lm*? En caso negativo, indicar motivos en observaciones.			
	Si el producto favorece el crecimiento de Lm, ¿el ensayo de desafío proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil? En caso negativo, indicar motivos en observaciones			
Observaciones:				

5.2.2. ENSAYOS DE DESAFÍO PARA EVALUAR LA TASA MÁXIMA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μmax)	**SÍ**	**NO**
Para evitar cambios físico-químicos en el producto, ¿se ha realizado la inoculación dentro de los 2 días posteriores a su fabricación?		
¿Se ha inoculado una sola cepa, caracterizada por origen y características de crecimiento, siendo la elección de la misma adecuada?		
El nivel de inoculación inicial es próximo a 100 ufc/g o ml (siempre entre 50-200 ufc/g o ml)		
¿El ensayo incluye también muestras de control para ver la presencia natural de *L. monocytogenes* en el producto?		
¿Se han inoculado al menos 11 muestras por lote?		
La técnica de inoculación es adecuada al tipo de producto y al escenario realista de contaminación “natural” y se comprueba que no altera de forma relevante las propiedades del alimento. *Ej.: inoculación en “superficie” para reproducir contaminación cruzada desde superficie de cortadora; inoculación en “profundidad” para*		

reproducir contaminación en productos sometidos a picado/amasado, etc.			
¿El ensayo se ha hecho a una temperatura entre 6 y 10ºC? ¿Se ha mantenido a la misma temperatura a lo largo de todo el ensayo? Nota: en productos con microbiota acompañante como bacterias ácido-lácticas, la Tª debe ser ≤ 8ºC)			
¿La duración del estudio ha sido suficiente para permitir construir la curva de crecimiento? *NOTA: puede ser inferior o superior a la vida útil estimada del producto.*			
Se ha inoculado y realizado recuento de Listeria en al menos 11 muestras, 3* en tiempo 0 (tras inocular) y 8 en el resto de las fases (5 de ellas al menos deben estar en fase de crecimiento exponencial) **Puede ser 1 si los 3 lotes se inoculan de manera simultánea*			
¿Ha construido una curva de crecimiento microbiano para cada lote inoculado, elaborada a partir de al menos 11 puntos (11 recuentos), que ha ajustado mediante una regresión no lineal? *NOTA: para valorar que la curva es correcta, se puede revisar:* – *Valor R-square: debe ser > 0,90.* – *La desviación estándar / velocidad máxima de crecimiento < 20% (*)* (*) Es importante que el error estándar no supere el 20 % de la estimación de µmax. De lo contrario, esto significa que existe una elevada incertidumbre asociada a µmax, por lo que este resultado debe interpretarse con precaución.			
A partir de la velocidad máxima más elevada de la calculada en cada lote, ¿se ha extrapolado a las Tª razonablemente previsibles de almacenamiento y conservación del producto y dicho cálculo se encuentra documentado? *NOTA: según información detallada y justificada, proporcionada por el OEA, estableciendo las mismas en el percentil 95 de sus observaciones o, en su defecto, según condiciones reflejadas en la tabla 4 del documento.*			
¿Ha estimado la concentración final de Listeria al final de la vida útil estimada, habiendo documentado dicho cálculo?			
Conclusión:	**¿El ensayo de desafío aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil**? En caso negativo, indicar motivos en observaciones		

Observaciones:	

ANEXO III – Ejemplos de aplicación

EJEMPLO 1- CONSIDERACIÓN ALC. BUTIFARRA BLANCA.

Planteamiento del ejemplo

El operador X fabrica butifarra blanca con carne de cerdo que **comercializa** en dos formatos de envasado, ambos sometidos a un tratamiento post letal en envase final.





El operador presenta la siguiente información/documentación para justificar la vida útil del producto:

Ficha técnica- Caracterización del producto

Vida útil propuesta	21 días
Conservación	3-6 °C
Modo de empleo	Una vez abierto el envase consumir en 48h
Presentación	Unidades entre 200 y 250 g de peso. Se elaboran dos presentaciones: - Una unidad envasada al vacío (200-250 g) - Envases de 10 unidades envasadas al vacío (2-2,5 Kg)

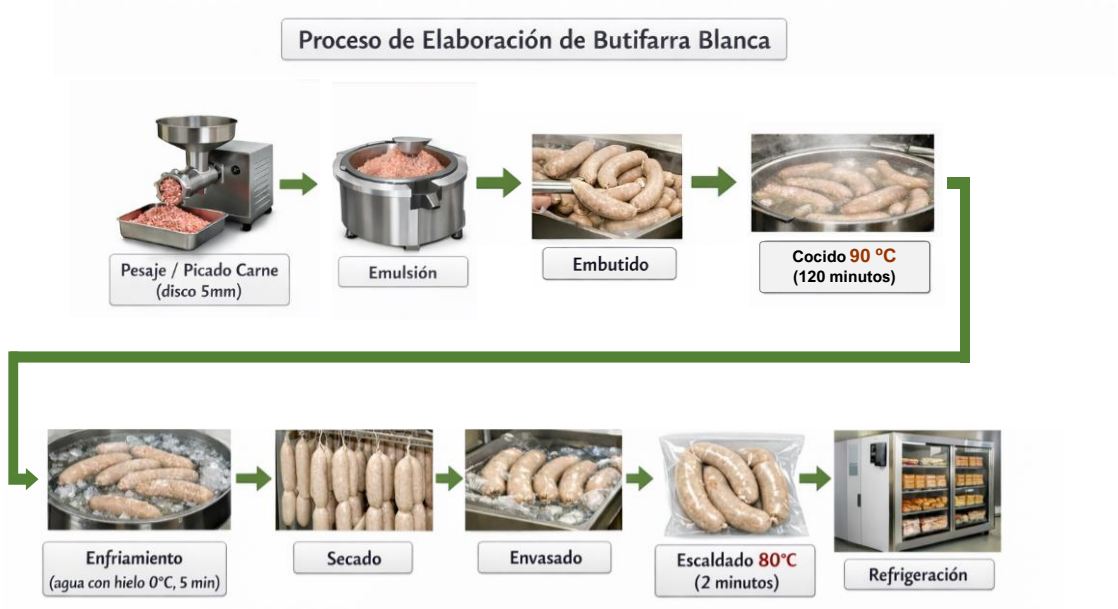
Asimismo, indica que en base a los ensayos que ha realizado en tres lotes fabricados en condiciones idénticas a las que se usarán para los productos que quieren comercializar y fabricados de forma independiente (diferentes lotes de materias primas y días de producción) su producto tiene las características físico-químicas que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Características físico-químicas de 3 lotes independientes de producción. Los valores indicados corresponden al promedio y desviación estándar (DE) de 5 determinaciones (cada una correspondiente a una unidad de muestreo independiente).

	Lote 20240306		Lote 20240701		Lote 20241118	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
pH	6,74	0,05	6,55	0,05	6,68	0,11
aw	0,974	0,002	0,981	0,001	0,975	0,006

Procesado

El siguiente diagrama ilustra el proceso de producción del producto, incluyendo los parámetros más relevantes que también se discutirán a continuación:



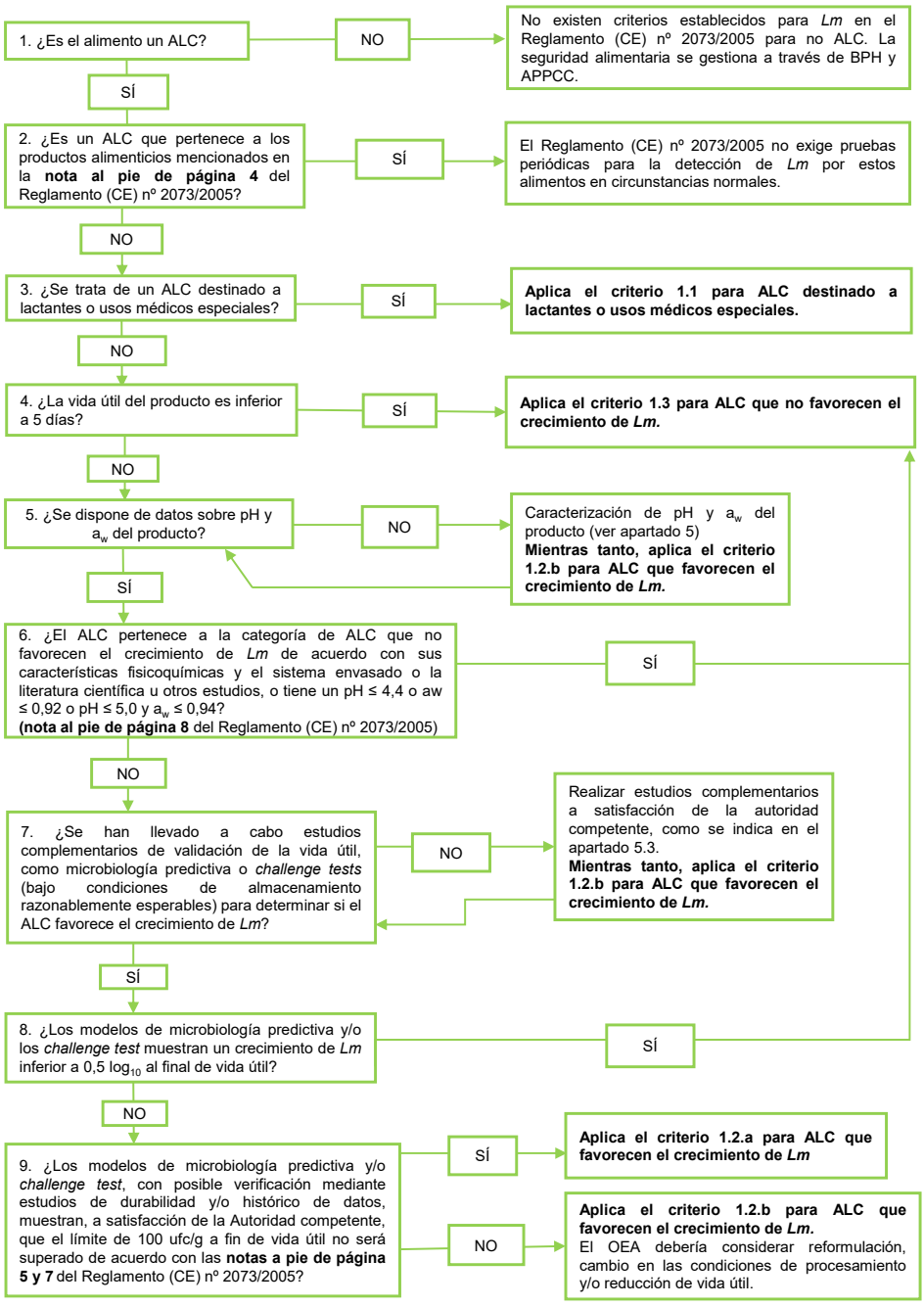
Descripción detallada del proceso de acuerdo con lo indicado por la empresa:

Se pesa y pica la carne con un disco de 5 mm, posteriormente se añaden el resto de los ingredientes (incluyendo sales nitrificantes) y se embute en tripa natural. Una vez embutido el producto se cuece (trata térmicamente) en agua a 90 °C durante 120 minutos, alcanzándose en el centro del producto una temperatura de al menos 70 °C durante más de 2 minutos.

El enfriamiento consiste en traslado desde la cubeta de cocción a la de enfriamiento e inmersión durante 5 minutos en agua próxima a los 0 °C. Se añade hielo para mantener la temperatura. Posteriormente se somete a un secado mediante aire frio (aproximadamente otros 5 minutos) y envasado automático en continuo. El conjunto de todos estos procesos supone aproximadamente 30 minutos de trabajo (desde el final de la cocción hasta el escaldado posterior en el envase final).

Finalmente se aplica un tratamiento térmico mediante inmersión en agua a 80 °C durante 2 minutos en el envase final. El producto así tratado se refrigera y queda listo para su distribución.

Aplicación del árbol de decisiones



Resolución del ejemplo

Pregunta 1: La butifarra blanca es un producto cárnico cocido. Si bien se puede cocinar antes de consumir, TRADICIONALMENTE se consume en muchas ocasiones sin ningún proceso culinario posterior[5], por lo que **se debe clasificar como Alimento Listo para el Consumo**.

[5]https://www.gastroteca.cat/wp-content/uploads/CAST-Apats_Catalunya-manual.pdf

Pregunta 2: En este caso es un producto que ha recibido un tratamiento térmico y, posteriormente, otro tratamiento térmico post letal en su envase final.

La cocción se considera un tratamiento térmico suficiente para eliminar *L. monocytogenes*, dado que garantiza y supera la aplicación de 70 °C durante 2 minutos en el centro de la pieza. Esto supone una reducción D-6 del número de células de *Lm* (Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil, AESAN, 2026). Es además un PCC validado que se vigila mediante el control de temperaturas y se verifica diariamente (cada día de elaboración) con sonda en 2 unidades. Los registros de vigilancia y verificación del último año son satisfactorios.

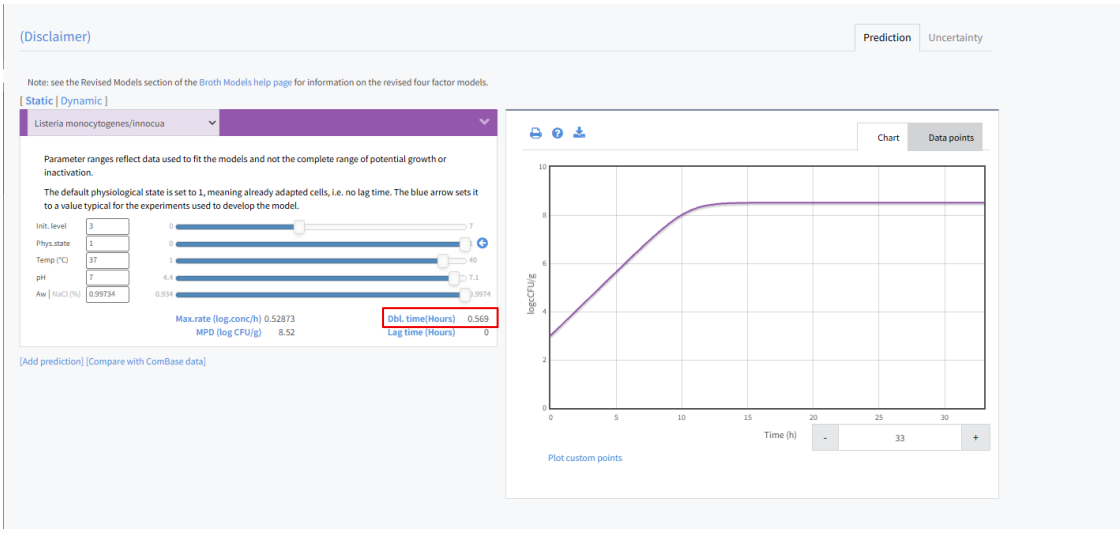
Las fases de enfriamiento/secado son muy relevantes pues durante ellas se puede producir una recontaminación del producto y, dependiendo de su duración, incluso se podría producir la multiplicación de *Lm*. Así hay que distinguir si durante esta fase/s se puede producir:

- Una recontaminación
- Una recontaminación + posible multiplicación.

Esto depende esencialmente de la temperatura y del tiempo que trascurre desde el final de la cocción hasta el escaldado posterior en el envase final.

Considerando la velocidad de crecimiento de *Lm* y la duración del proceso (30 minutos de procesado en conjunto desde el final de la cocción hasta el escaldado posterior en el envase final) y que todo se produce en refrigeración se puede concluir que, durante estas fases (enfriamiento + secado) es posible la recontaminación pero no el crecimiento de *Lm.*

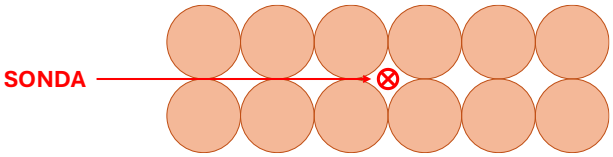
Esta afirmación se basa en que el tiempo de todo el proceso (unos 30 minutos) es inferior incluso al tiempo de duplicación de *Lm.* en condiciones óptimas (pH 7,0; a_w~1 y 37 °C) que, de acuerdo con ComBase (https://combasebrowser.errc.ars.usda.gov/) es de 34,14 minutos.



Finalmente, el escaldado está considerado como tratamiento post letal para eliminar esta potencial contaminación superficial en la fase de exposición. Según indica la

empresa, el tratamiento consiste en sumergir el producto, en su envase final, en agua a 80 °C durante 2 minutos.

Si bien este segundo tratamiento térmico podría ser suficiente para alcanzar la inactivación requerida por la autoridad competente (D-1 en la superficie del producto) es necesario demostrarlo mediante un estudio de validación específico (medida de la temperatura en el interior del envase). Debe tenerse en cuenta que, en el caso de las butifarras envasadas en varias capas, el sensor de temperatura deberá colocarse en el punto "más frío" del paquete. Dadas las características del proceso este punto se situará en el centro en envase aproximadamente, entre las dos capas de butifarras, y en la superficie de estas.



En resumen, la información aportada por el proveedor demuestra que el primer tratamiento térmico es suficiente para eliminar *L. monocytogenes.*

En relación con el segundo tratamiento, que se realiza con el alimento en su envase final, no se aportan evidencias que demuestren que se alcanza la intensidad del tratamiento suficiente, puesto que no se ha validado el tratamiento aplicado.

Por ello **NO SE PUEDE CONSIDERAR** que este producto sea un alimento listo para el consumo que ha recibido un tratamiento listericida validado sin posibilidad de recontaminación.

Respuestas al listado de verificación

2. ALC QUE NO REQUIEREN PRUEBAS REGULARES PARA LA DETECCIÓN DE *Lm* EN CIRCUNSTANCIAS NORMALES. NOTA 4 REGLAMENTO (CE) 2073/2005	**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
¿El alimento pertenece a alguna de las siguientes categorías? - Los que hayan recibido un tratamiento listericida validado sin posibilidad de recontaminación (por ejemplo, tratamiento en su envase final) (ver apartado 5: reducciones logarítmicas) - Frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas - Pan, galletas y productos similares, - Aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares, - Azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate, - Moluscos bivalvos vivos - Sal de cocina		**X**	

Conclusión: El operador puede justificar que el ALC pertenece a las categorías de productos anteriores (no se exige realizar pruebas regulares con respecto al criterio 1.3).		**X**	
Observaciones:			

Conclusión

La documentación presentada hace que el resultado de la verificación del estudio sobre la vida útil establecida para el producto se considere **NO SUFICIENTE** ya que no se demuestra que este producto sea un alimento listo para el consumo que ha recibido un tratamiento listericida validado sin posibilidad de recontaminación.

CONTINUACIÓN DEL EJEMPLO

Conforme a lo indicado, la empresa realiza una medición mediante sonda inalámbrica de la temperatura en el interior de los envases (y en las posiciones indicadas de la superficie del producto) obteniendo los siguientes resultados:

-Butifarra en envase final individual: la medición con sonda en el punto más frio del escaldado a 80 °C durante 2 minutos en el envase final indica que alcanza una temperatura de al menos 70 °C durante 2 minutos.

Esto supone que se alcanza una inactivación de más de 6-D de *Lm*. Por lo tanto, el producto podría clasificarse dentro de la categoría 1.3.

-Butifarra en envase final de 10 unidades: La medición con sonda en el punto más frio del escaldado a 80 °C durante 2 minutos en el envase final indican que, en el mejor de los escenarios posibles, se alcanza una temperatura de al menos 70 °C durante 15 segundos, lo que supondría menos de 1-D de inactivación de *Lm*[6] y por lo tanto se consideraría insuficiente para considerarlo un tratamiento de post-letalidad eficaz para eliminar la recontaminación.

Por ello, la empresa decide aumentar la temperatura del escaldado de los envases de 10 unidades, siendo la nueva temperatura del baño de 85 °C y manteniéndose los 5 minutos de duración. En estas condiciones la temperatura registrada por la sonda es de al menos 70 °C durante 1,17 minutos. Esto supone que se alcanza una inactivación de más de 3-D[7] de *Lm* lo que se considera suficiente para validar la eficacia del tratamiento térmico post-letal aplicado en el envase final.

Dado que el tratamiento se aplica en el envase final, la recontaminación tras el tratamiento no es posible. Por ello, el producto pertenece a un ALC para el que no se exige realizar pruebas regulares con respecto al criterio microbiológico de seguridad alimentaria de *Lm.*

En este punto es necesario señalar que esta medida se ha demostrado adecuada para este producto y estas condiciones de producción/tratamiento concretas. Cada proceso

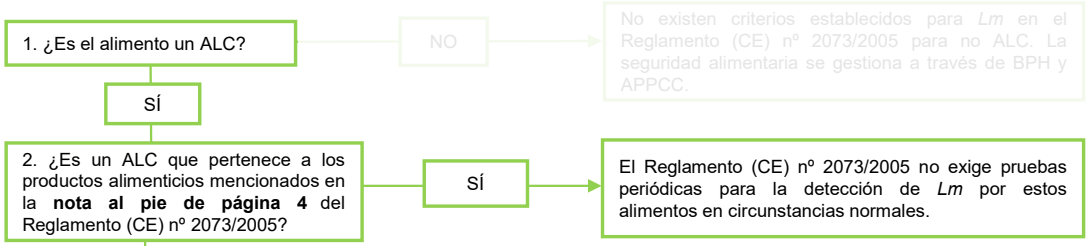
[6] Siendo necesarios 2 minutos a 70 ºC para alcanzar 6D, 1D se alcanzaría con 0,33 minutos o lo que es igual 20 segundos a esta misma temperatura.
[7] Siendo necesarios 2 minutos a 70 ºC para alcanzar 6D, 3D se alcanzarían con 1 minuto a esta misma temperatura.

productivo deberá ser estudiado individualmente para poder valorar adecuadamente los posibles riesgos, medidas de control propuestas, etc.

Respuestas al listado de verificación

2. ALC QUE NO REQUIEREN PRUEBAS REGULARES PARA LA DETECCIÓN DE *Lm* EN CIRCUNSTANCIAS NORMALES. NOTA 4 REGLAMENTO (CE) 2073/2005	**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
¿El alimento pertenece a alguna de las siguientes categorías? - Los que hayan recibido un tratamiento listericida validado sin posibilidad de recontaminación (por ejemplo, tratamiento en su envase final) (ver apartado 5: reducciones logarítmicas) - Frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas - Pan, galletas y productos similares, - Aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares, - Azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate, - Moluscos bivalvos vivos - Sal de cocina	**X**		
Conclusión: El operador puede justificar que el ALC pertenece a las categorías de productos anteriores (no se exige realizar pruebas regulares con respecto al criterio 1.3).	**X**		
Observaciones:			

Respuesta al árbol de decisiones



Conclusión

Con los nuevos datos aportados y los cambios en el proceso la documentación presentada hace que el resultado de la verificación del estudio se considere **SUFICIENTE** ya que demuestra que el ALC pertenece a la categoría de alimentos que han recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar la *Lm*, cuando la

recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final), por lo que el Reglamento (CE) 2073/2005 no exige pruebas periódicas para la detección de *Lm* en circunstancias normales.

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

El alimento se clasificaría dentro de los mencionados en la nota a pie de página 4 del Reglamento (CE) nº 2073/2005.

Es responsabilidad del operador verificar que los lotes producidos a partir de la verificación suficiente del estudio siguen cumpliendo el criterio para mantenerse dentro de los alimentos listos para el consumo mencionados en la nota a pie de página 4, es decir, que todos los lotes producidos se tratan térmicamente después de envasar los productos de acuerdo con las condiciones de tiempo y temperatura validadas y se alcanza el criterio de funcionamiento aplicable.

EJEMPLO 2 – CARACTERIZACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DE LA CATEGORIZACIÓN 1.3 EN BASE A LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL ALIMENTO. TOMATE RALLADO.

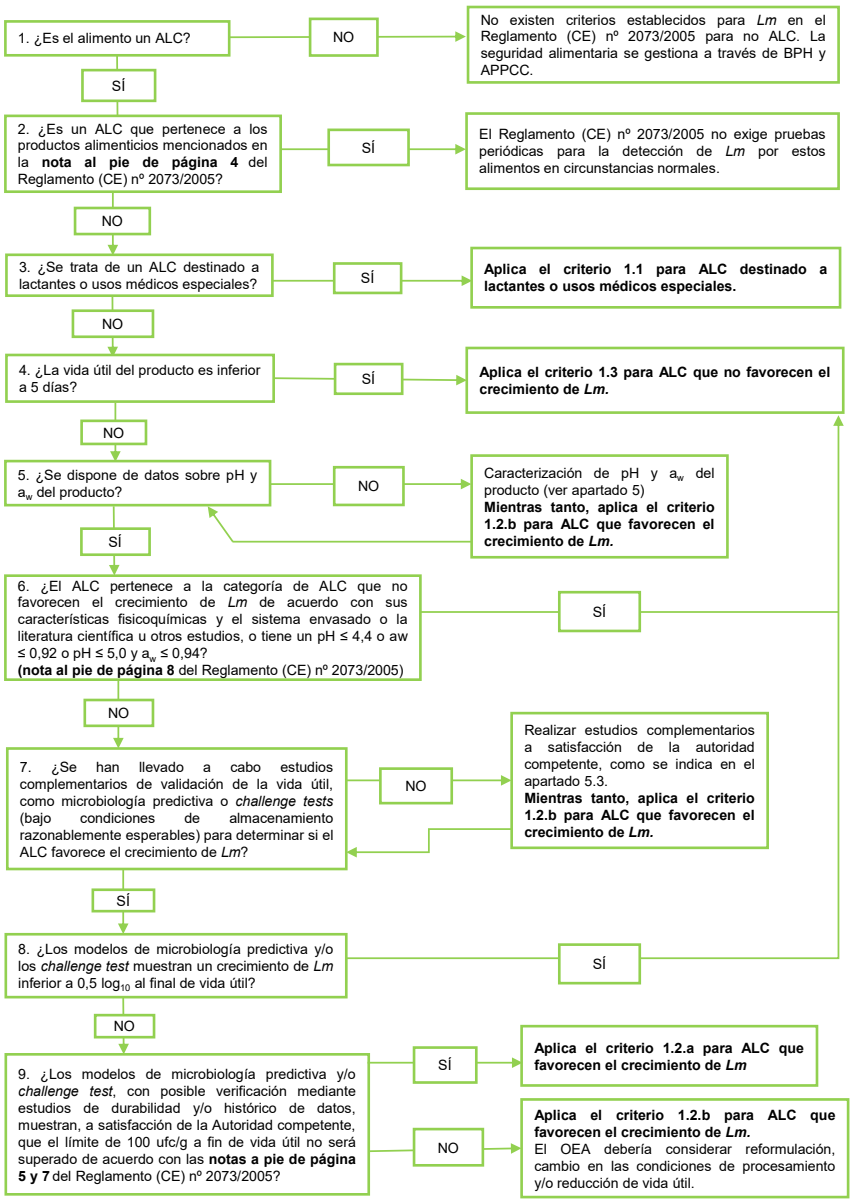
Planteamiento del ejemplo.

Un operador X fabrica tomate rallado listo para el consumo con una vida útil superior a 5 días. Para justificar la categorización del alimento como 1.3 en base a las características fisicoquímicas, el operador proporciona a las autoridades sanitarias los resultados de la determinación del pH de diversas muestras, con las que pretende demostrar que es un alimento que no puede favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes* (categoría 1.3) ya que el pH sería inferior a 4,4.

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.3 Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo *de L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4) (8)	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

(8) Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92, productos con pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.*

Aplicación del árbol de decisiones.



Pregunta 1: Sí.

Pregunta 2: No.

Pregunta 3: No.

Pregunta 4: No.

Pregunta 5: ¿?

Por lo tanto, la información aportada debe demostrar que las propiedades fisicoquímicas del alimento no permiten el crecimiento de *Listeria monocytogenes.*

RESOLUCIÓN DEL EJEMPLO

El operador presenta los siguientes resultados de la medición de la acidez del producto:

- muestra 1: pH = 4,30
- muestra 2: pH = 4,19
- muestra 3: pH = 4,26
- muestra 4: pH = 4,24
- muestra 5: pH = 4,29

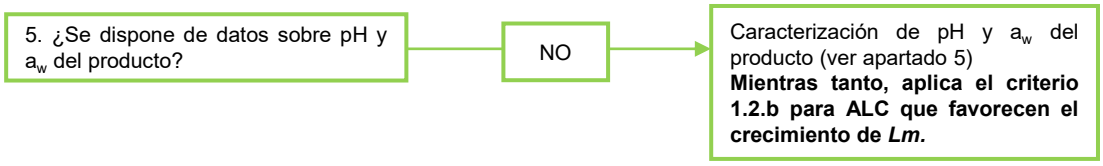
¿Se puede concluir que el operador presenta suficiente evidencia para justificar que el alimento no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes* y que, por tanto, se incluiría en la categoría 1.3?
No. El alimento no está bien caracterizado. El operador únicamente proporciona 5 muestras, de un único lote. Son necesarios tres lotes del mismo alimento, con un mínimo de 5 muestras cada uno, para tener en cuenta la variabilidad inter e intra lotes. Por tanto, **no se considera demostrado que el alimento no puede favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes***.

A esta conclusión se llega aplicando el apartado 3 del listado de verificación en relación a la caracterización del producto (que permite responder la pregunta 5 del árbol de decisiones):

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA DEL PRODUCTO.		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
La caracterización del producto incluye:	pH	**X**		
	a_w			*
	Concentración de aditivos			*
	Estructura (sólido, líquido)			*
	Microbiota habitual			*
	Compuestos fenólicos			*
	Otros			*
¿Se dispone de un mínimo de 15 datos de pH y /o de aw correspondientes a tres lotes diferentes (n= 5/ lote) representativos de la producción?			**X**	
Se caracteriza la variabilidad intra e inter-lote de pH y / o a_w, y se estima que la probabilidad de que el pH y/o la a_w sean superiores al límite establecido en la nota 8 es inferior al 5% (es decir, existe una confianza estadística superior al 95% de que el pH y/o la a_w es inferior al límite establecido). - **pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92** - **pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94**			**X**	
Para los alimentos multicomponente (por ejemplo, un sándwich) estos valores se han calculado para cada uno de los componentes separados del producto una vez montado, esperando el tiempo suficiente para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes. Se ha considerado el				**X**

componente más favorable para el crecimiento microbiano. No se deben calcular a partir de una muestra homogeneizada del producto completo.			
Se caracterizan otros factores intrínsecos o extrínsecos empleados para justificar la vida útil establecida (p.ej., concentración de aditivos).		**X**	
La vida útil establecida es inferior a 5 días		**X**	
Conclusión: El alimento está correctamente caracterizado.		**X**	
Observaciones:			
Conclusión: El operador puede justificar que pertenece a la categoría 1.3 de productos que no pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes* por pH/a_w (nota 8 Reglamento (CE) 2073/2005).		**X**	
Observaciones: * Fuera del ámbito de este ejemplo. Los ejemplos se han elegido sobre aspectos concretos del alimento, sin aportar detalles de otros aspectos.			

Respuesta al árbol de decisiones.



Conclusión.

Así pues, se concluye que la empresa no ha caracterizado bien su producto. No ha proporcionado evidencias que demuestren de manera satisfactoria que el producto no puede favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, y el resultado de la valoración del estudio por parte del control oficial es que la verificación se considera **NO SUFICIENTE.**

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

En este caso, mientras se amplía la caracterización del alimento, se clasificaría dentro de la **categoría 1.2b del Reglamento (CE)** nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria **No detectado en 25 g** para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.2 Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
		5	0	No detectado en 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil

(7) Este criterio se aplica si el explotador de la empresa alimentaria que los haya producido no ha podido demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.

CONTINUACIÓN DEL EJEMPLO

El mismo operador presenta una revisión de la información que incluye los siguientes datos:

Lote #1: 01/03/2025	**Lote #2: 25/07/2025**	**Lote #3: 04/10/2025**
- muestra 1: pH = 4,31 - muestra 2: pH = 4,19 - muestra 3: pH = 4,26 - muestra 4: pH = 4,24 - muestra 5: pH = 4,29	- muestra 6: pH = 4,13 - muestra 7: pH = 4,05 - muestra 8: pH = 4,07 - muestra 9: pH = 4,04 - muestra 10: pH = 4,13	- muestra 11: pH = 4,30 - muestra 12: pH = 4,35 - muestra 13: pH = 4,34 - muestra 14: pH = 4,26 - muestra 15: pH = 4,27

¿Se puede concluir que el operador presenta suficiente evidencia para justificar que el alimento no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes* y que, por tanto, se incluiría en la categoría 1.3?
El operador proporciona la información mínima necesaria para la caracterización físico-química del alimento: 15 muestras (5 muestras de 3 lotes diferentes).

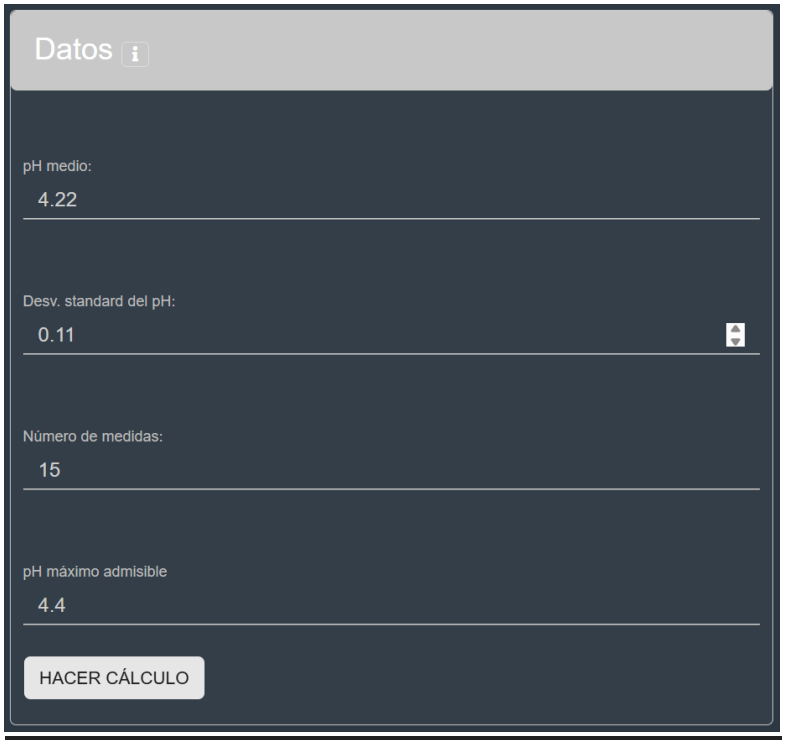
En un caso real, sería responsabilidad del operador asegurar que los lotes caracterizados sean representativos de la variabilidad de la producción real.

Una vez proporcionada la cantidad de información necesaria para la caracterización del alimento, se procede a comprobar si el alimento puede ser incluido en la categoría 1.3, teniendo en cuenta la variabilidad de sus características fisicoquímicas.

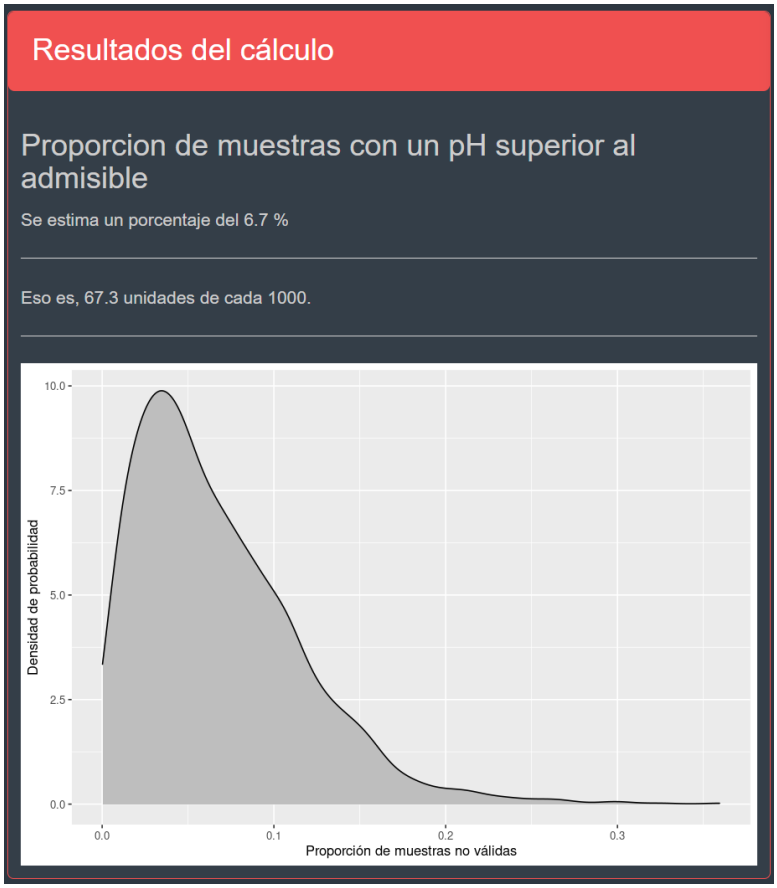
La herramienta BIOQURA implementa funciones para realizar estas comprobaciones. En primer lugar, se requiere calcular el valor medio (función PROMEDIO en Excel) y la desviación estándar (función DESVEST.M en Excel) de todas las medidas.

Características del tomate rallado	
pH (valor medio)	4,22
Desviación estándar	0,11
Nº de muestras	15

Esta información se puede introducir en la herramienta BIOQURA



Obteniendo el siguiente resultado:



La herramienta, teniendo en cuenta la variabilidad inter e intra-lotes, calcula una probabilidad de que el pH sea superior al valor admisible (pH 4,4) del 6,7%, superior al 5% establecido (Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil, AESAN, 2026). Es decir, la confianza en la estimación de que el pH sea inferior a 4,4 solo alcanza el 93,3%, por lo que el nivel de confianza estaría por debajo del límite establecido por el gestor (95%).

Por lo tanto, la caracterización fisicoquímica del alimento no presenta suficiente evidencia de que el producto no puede favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*, a pesar de que ninguna muestra supera el valor límite de pH. Esto puede indicar que el muestreo no es suficientemente amplio para garantizar la confianza estadística.

CONTINUACIÓN DEL EJEMPLO

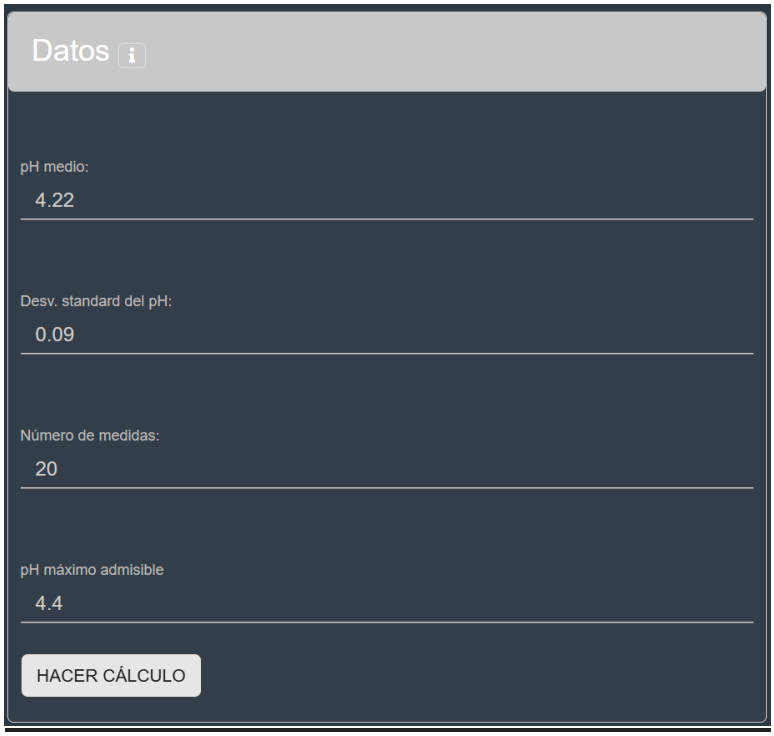
Al aportar mayor cantidad de datos se hace más robusto el cálculo estadístico, mejorando la estimación, por lo que el operador aporta datos de un nuevo lote:

Lote #4: 07/11/2025
- muestra 16: pH = 4,29 - muestra 17: pH = 4,19 - muestra 18: pH = 4,27 - muestra 19: pH = 4,28 - muestra 20: pH = 4,29

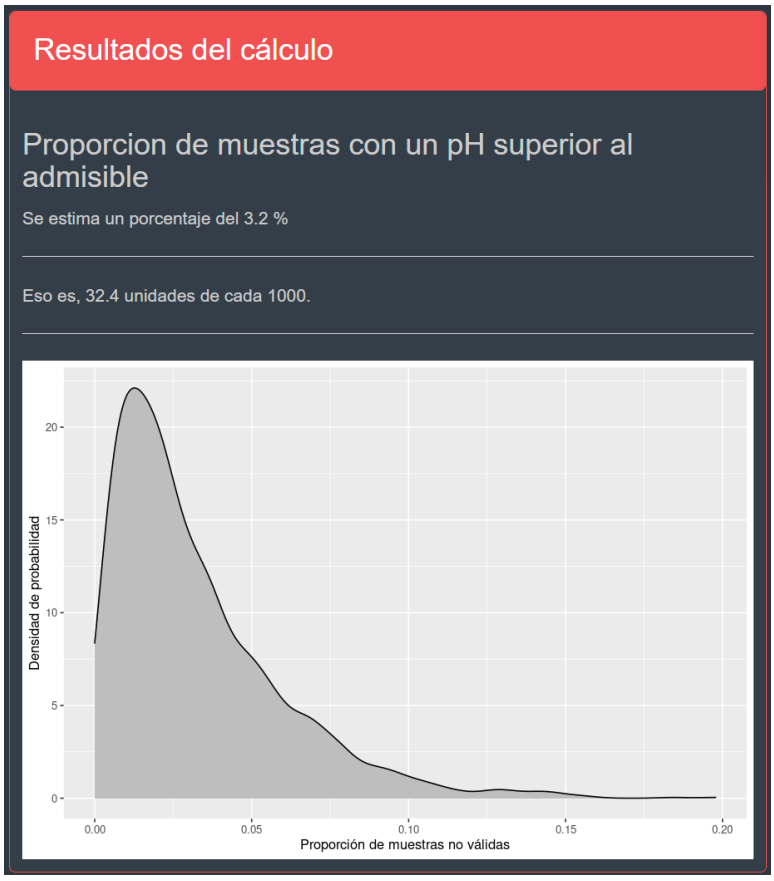
Se calcula de nuevo el valor medio del pH y la desviación estándar, ahora sumando los nuevos datos a los ya existentes:

Características del tomate rallado	
pH (valor medio)	4,22
Desviación estándar	0,09
Nº de muestras	20

Esta información se introduce de nuevo en la herramienta BIOQURA



Obteniendo el siguiente resultado:



Ahora, la herramienta calcula una probabilidad de que el pH sea superior al valor admisible (pH 4,4) del 3,2%, que ahora sí es inferior al 5% establecido. Es decir, la confianza en la estimación de que el pH sea inferior a 4,4 alcanza el 96,8%, por lo que el nivel de confianza ya es superior al límite establecido (95%).

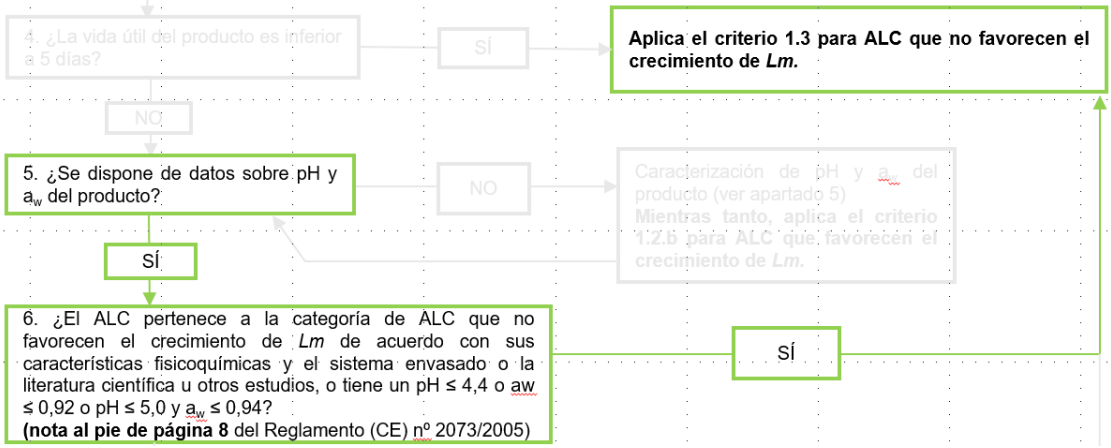
Por lo tanto, la caracterización fisicoquímica del alimento ahora sí presenta suficiente evidencia de que el producto no puede favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Aplicando el apartado 3 del listado de verificación en relación a la definición y caracterización del producto (que permite responder la pregunta 5 del árbol de decisiones) estaríamos en la siguiente situación:

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA DEL PRODUCTO.		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
La caracterización del producto incluye:	pH	**X**		
	a_w			*
	Concentración de aditivos			*
	Estructura (sólido, líquido)			*
	Microbiota habitual			*
	Compuestos fenólicos			*
	Otros			*
¿Se dispone de un mínimo de 15 datos de pH y /o de aw correspondientes a tres lotes diferentes (n= 5/ lote) representativos de la producción?		**X**		
Se caracteriza la variabilidad intra e inter-lote de pH y / o a_w, y se estima que la probabilidad de que el pH y/o la a_w sean superiores al límite establecido en la nota 8 es inferior al 5% (es decir, existe una confianza estadística superior al 95% de que el pH y/o la a_w es inferior al límite establecido). - **pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92** - **pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94**		**X**		
Para los alimentos multicomponente (por ejemplo, un sándwich) estos valores se han calculado para cada uno de los componentes separados del producto una vez montado, esperando el tiempo suficiente para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes. Se ha considerado el componente más favorable para el crecimiento microbiano. No se deben calcular a partir de una muestra homogeneizada del producto completo.				**X**

Se caracterizan otros factores intrínsecos o extrínsecos empleados para justificar la vida útil establecida (p.ej., concentración de aditivos).		**X**	
La vida útil establecida es inferior a 5 días		**X**	
Conclusión: El alimento está correctamente caracterizado.	**X**		
Observaciones:			
Conclusión: El operador puede justificar que pertenece a la categoría 1.3 de productos que no pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes* por pH/a_w (nota 8 Reglamento (CE) 2073/2005).	**X**		
Observaciones: * Fuera del ámbito de este ejemplo. Los ejemplos se han elegido sobre aspectos concretos del alimento, sin aportar detalles de otros aspectos.			

Respuesta al árbol de decisiones.



Conclusión.

Así pues, se concluye que la empresa ha proporcionado evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no puede favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, y el resultado de la valoración del estudio por parte del control oficial es que la verificación se considera **SUFICIENTE.**

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

En este caso, el alimento se clasificaría dentro de la **categoría 1.3 del Reglamento (CE)** nº 2073/2005 y le aplicaría el criterio de seguridad alimentaria **100 ufc/g** para *Listeria monocytogenes*, según se indica a continuación:

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.3 Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo *de L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4) (8)	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

(8) Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con pH ≤ 4,4 o a w ≤ 0,92, productos con pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.*

Es responsabilidad del operador verificar que los lotes producidos a partir de la verificación suficiente del estudio siguen cumpliendo el criterio para mantenerse en la categoría 1.3.

EJEMPLO 3 - CARACTERIZACIÓN DE UN ALIMENTO MULTICOMPONENTE. SÁNDWICH.

Planteamiento del ejemplo

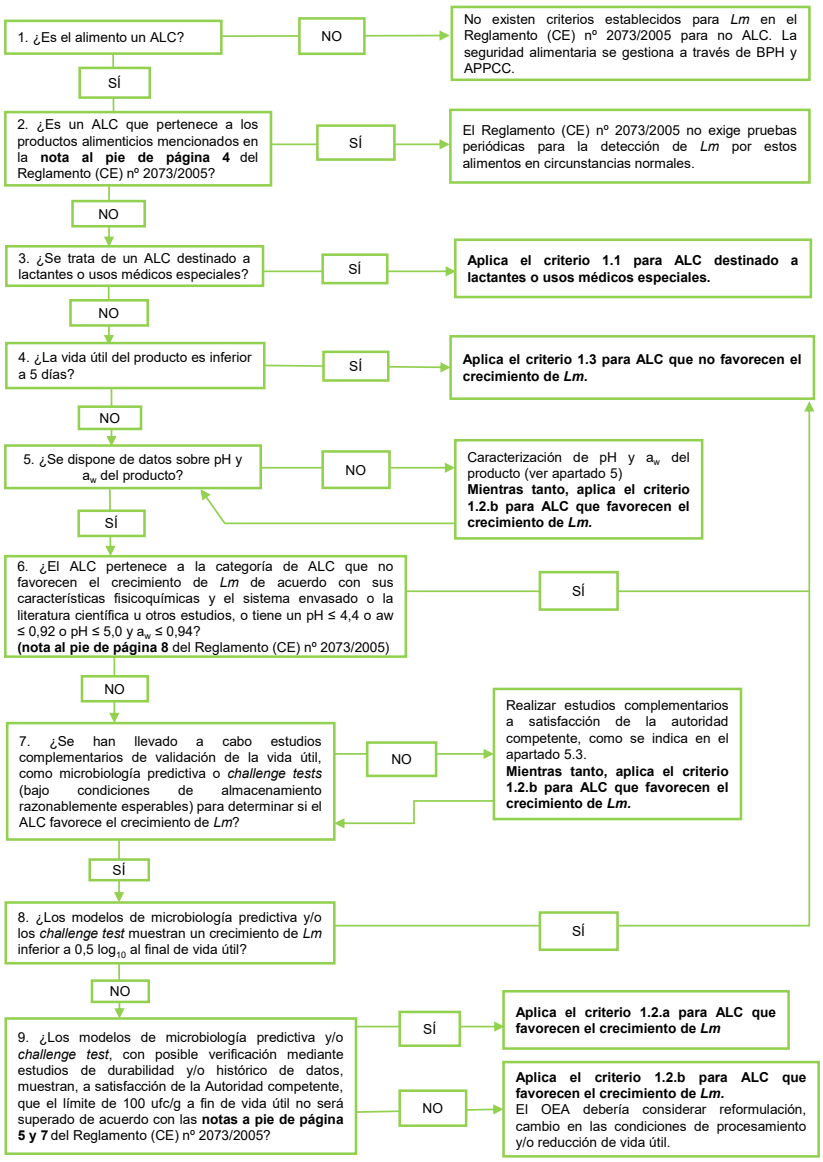
Un operador X fabrica sándwiches listos para el consumo con una vida útil superior a 5 días. Se trata de sándwiches dobles con dos rellenos diferentes. Uno de ellos contiene una loncha de queso y lechuga, mientras que el otro está constituido por una mezcla de tomate, atún y mayonesa.

La siguiente tabla resume los parámetros más relevantes del producto para este ejemplo:

Nombre:	Sándwich de tomate, atún, queso Gouda y lechuga.
Ingredientes:	Pan de molde (45%), tomate (14%), atún claro (13%), queso Gouda (12%), lechuga (10%) y salsa mayonesa (6%).
Elaboración	Antes de montar los ingredientes del sándwich, el pan de molde se corta en rebanadas y posteriormente en triángulos, el tomate se corta en rodajas, el queso se corta en lonchas y el atún se desmigaja y se mezcla íntimamente con la mayonesa, considerándose el atún con mayonesa un único componente del sándwich.
Presentación:	Formato individual de 180 g (peso neto)
Envasado:	Envase de plástico en atmósfera modificada
Almacenamiento:	Refrigeración (0 – 4°C)
Vida útil	18 días

El operador quiere encargar un estudio complementario para justificar la vida útil de su producto para lo cual, siguiendo el árbol de decisiones, debe realizar previamente una caracterización físico-química del mismo.

Aplicación del árbol de decisiones.



Pregunta 1: Sí.

Pregunta 2: No.

Pregunta 3: No.

Pregunta 4: No.

Pregunta 5: ¿?

RESOLUCIÓN DEL EJEMPLO

Para llevar a cabo esta caracterización, el operador proporciona al laboratorio de análisis los valores de pH y a_w del sándwich (un conjunto de datos superior a 20, correspondientes a diferentes lotes), tras realizar una mezcla homogénea (picado mecánico del sándwich completo hasta obtener una pasta de aspecto homogéneo) de todos los ingredientes.

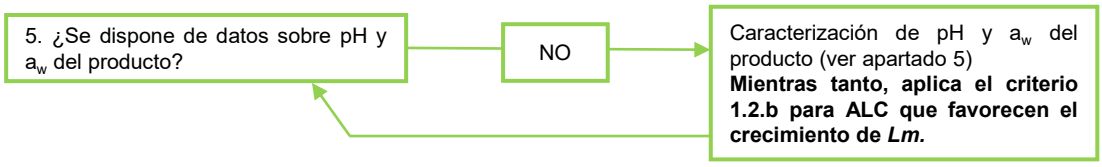
	pH		a_w	
	Media ± DE [1]	Percentil 95	Media ± DE [1]	Percentil 95
Sándwich [2]	5,17 ± 0,11	5,31	0,986 ± 0,006	0,991

[1] DE: desviación estándar.

[2] valores obtenidos tras mezclar homogéneamente todos los ingredientes del sándwich.

¿Se puede concluir que el operador ha caracterizado correctamente el alimento?
No. El operador ha presentado datos suficientes que cubren un periodo largo de tiempo para conocer la distribución de los parámetros fisicoquímicos. Sin embargo, el alimento no está bien caracterizado: el operador ha homogeneizado los componentes del sándwich, pero debería caracterizar cada componente de manera individual, separados del producto una vez montado, y esperando el tiempo suficiente para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes. Las determinaciones deberían realizarse tras un periodo de tiempo suficiente que permita que tengan lugar las transferencias de humedad y de solutos entre los distintos ingredientes en contacto. Estas interacciones pueden modificar el pH y la a_w de cada componente respecto a sus valores iniciales y, por tanto, influir en el comportamiento microbiológico real del producto. Por tanto, **no se considera que el producto esté bien caracterizado**.

Respuesta al árbol de decisiones.



Conclusión.

Así pues, se concluye que la empresa no ha caracterizado bien su producto**.**

CONTINUACIÓN DEL EJEMPLO

El laboratorio de análisis le indica que esos datos no son adecuados y que necesitaría los datos de los ingredientes una vez montado el sándwich, y esperando el tiempo suficiente para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes.

El operador dispone de los datos de los parámetros fisicoquímicos de las materias primas, obtenidos por separado antes de montar el sándwich, que se los facilita al laboratorio.

	pH		a_w	
	Media ± DE [1]	Percentil 95	Media ± de [1]	Percentil 95
Pan	5,46 ± 0,04	5,51	0,955 ± 0,004	0,960
Lechuga	6,07 ± 0,04	6,12	0,994 ± 0,003	0,997
Queso	5,28 ± 0,03	5,31	0,973 ± 0,002	0,980
Tomate	4,34 ± 0,02	4,35	0,996 ± 0,002	0,999
Atún con mayonesa	5,06 ± 0,02	5,08	0,990 ± 0,002	0,991

[1] DE: desviación estándar.

Sin embargo, el laboratorio le indica que esos datos siguen sin ser suficientes, ya que los datos deben corresponder a los ingredientes una vez que se ha montado el sándwich y esperado a que se haya dado la interacción entre los ingredientes y se haya alcanzado el equilibrio de pH y a_w. Los datos de las materias primas antes de la interacción tampoco son adecuados. Así pues, el operador y el laboratorio acuerdan caracterizar el alimento 24 horas después de haber montado el sándwich.
Para ello analizan 15 muestras (cinco unidades de tres lotes diferentes, representativos de la producción). Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Lote #1: 19/04/2026			Lote #2: 26/07/2026			Lote #3: 02/09/2026		
muestra 1	pH	a_w	muestra 6	pH	a_w	muestra 11	pH	a_w
pan[1]	5,62	0,981	pan[1]	5,66	0,980	pan[1]	5,65	0,981
lechuga	6,01	0,986	lechuga	6,00	0,988	lechuga	6,03	0,987
queso	5,40	0,976	queso	5,39	0,977	queso	5,43	0,977
tomate	4,45	0,991	tomate	4,40	0,993	tomate	4,43	0,997
salsa atún	4,94	0,990	salsa atún	5,00	0,991	salsa atún	5,00	0,990
muestra 2	pH	a_w	muestra 7	pH	a_w	muestra 12	pH	a_w
pan[1]	5,69	0,982	pan[1]	5,69	0,981	pan[1]	5,70	0,980
lechuga	6,00	0,983	lechuga	6,00	0,987	lechuga	6,02	0,987
queso	5,39	0,977	queso	5,35	0,976	queso	5,39	0,976
tomate	4,43	0,993	tomate	4,44	0,992	tomate	4,45	0,998
salsa atún	4,95	0,992	salsa atún	5,00	0,990	salsa atún	5,02	0,990
muestra 3	pH	a_w	muestra 8	pH	a_w	muestra 13	pH	a_w
pan[1]	5,66	0,980	pan[1]	5,65	0,983	pan[1]	5,63	0,979
lechuga	6,02	0,982	lechuga	6,01	0,985	lechuga	5,94	0,986
queso	5,38	0,973	queso	5,38	0,972	queso	5,38	0,971
tomate	4,43	0,992	tomate	4,43	0,995	tomate	4,44	0,996
salsa atún	5,02	0,991	salsa atún	4,98	0,989	salsa atún	5,02	0,993
muestra 4	pH	a_w	muestra 9	pH	a_w	muestra 14	pH	a_w
pan[1]	5,62	0,979	pan[1]	5,61	0,982	pan[1]	5,69	0,979
lechuga	6,00	0,984	lechuga	6,02	0,985	lechuga	5,95	0,988
queso	5,41	0,972	queso	5,41	0,975	queso	5,40	0,978
tomate	4,39	0,989	tomate	4,43	0,995	tomate	4,34	0,996
salsa atún	5,01	0,989	salsa atún	4,99	0,992	salsa atún	4,95	0,989

muestra 5	pH	a_w
pan[1]	5,61	0,978
lechuga	5,99	0,989
queso	5,40	0,975
tomate	4,44	0,994
salsa atún	4,94	0,990

muestra 10	pH	a_w
pan[1]	5,65	0,979
lechuga	5,99	0,991
queso	5,43	0,977
tomate	4,39	0,994
salsa atún	4,97	0,988

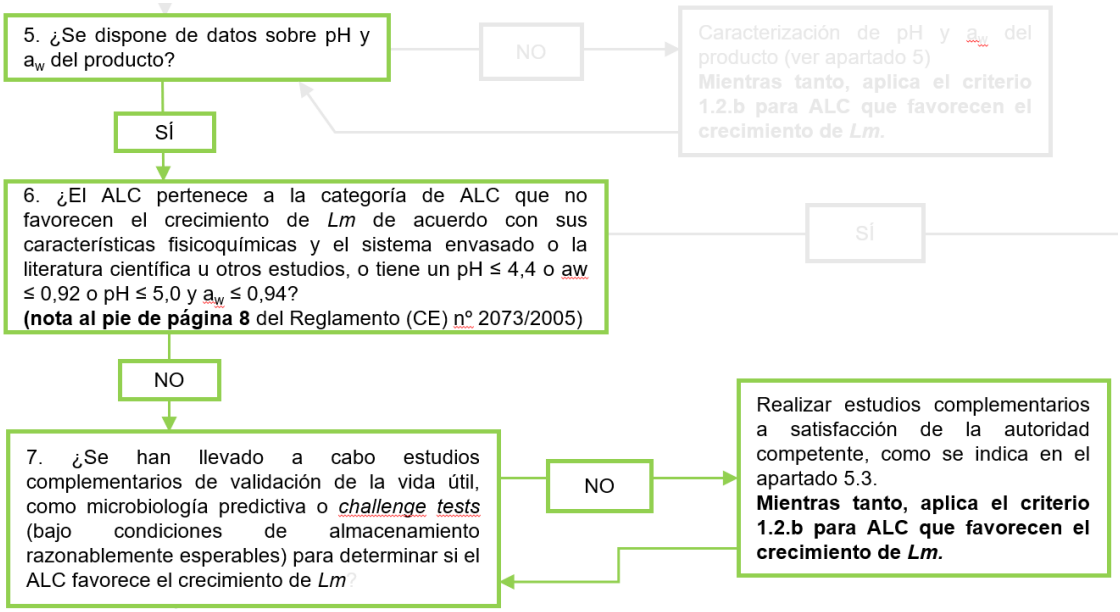
muestra 15	pH	a_w
pan[1]	5,65	0,978
lechuga	5,97	0,987
queso	5,38	0,974
tomate	4,47	0,995
salsa atún	4,99	0,991

[1] Se ha analizado la rebanada de pan externa inferior, en contacto con la lechuga. El pan es uno de los alimentos mencionados en la nota 4 del Reglamento (CE) nº 2073/2005, por lo que, en circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a *Lm.* Sin embargo, en este ejemplo, las características de pH y a_w se podrían ver alteradas por la interacción con otros ingredientes, por lo que conviene su caracterización.

Este ejemplo se ha realizado con rigor científico para justificar el componente del sándwich que presenta unas condiciones de crecimiento más favorables para el crecimiento de *Listeria monocytogenes.*
En el caso real de un alimento en el que se pueda justificar que, después de alcanzar el equilibrio, alguno de los componentes presenta unas características intrínsecas que se encuentran claramente fuera de los límites de crecimiento de *L. monocytogenes*, no sería necesario realizar una caracterización exhaustiva de ese componente.

¿Se puede concluir que el operador ha caracterizado correctamente el alimento?
Sí. El operador ha presentado datos de cada componente del sándwich de manera individual, después de haber montado el producto, y esperando el tiempo suficiente para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes. Por tanto, **se considera que el producto está bien caracterizado**.

Respuesta al árbol de decisiones.



Para determinar el componente en el que, una vez alcanzado el equilibrio tras la interacción entre los componentes, se van a presentar las condiciones más favorables para el crecimiento de *Listeria monocytogenes,* se calculan los valores medios de los parámetros fisicoquímicos de las 15 muestras tras un día de contacto entre los ingredientes.

Estos valores son introducidos en Combase, con el único fin de conocer que combinación de parámetros de pH y a_w de cada uno de los componentes proporciona las condiciones más favorables para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y no como validación del crecimiento real que tendría *L. monocytogenes,* en esos componentes.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla, en las que se puede apreciar que la lechuga es el componente en el que, una vez alcanzado el equilibrio, permitiría un crecimiento más rápido de *Listeria monocytogenes* (velocidad de crecimiento más alta). Los gráficos que proporciona Combase se muestran la siguiente tabla:

	pH	a_w	Velocidad de crecimiento a 4°C (log conc./h)
Pan	5,65	0,980	0,00974
Lechuga	6,00	0,986	0,013
Queso	5,39	0,975	0,00691
Tomate	4,42	0,994	0,00286
Atún con mayonesa	4,97	0,990	0,00611

Aplicación del listado de verificación:

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA DEL PRODUCTO.		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
La caracterización del producto incluye:	pH	**X**		
	a_w	**X**		
	Concentración de aditivos			**X**
	Estructura (sólido, líquido)	**X**		
	Microbiota habitual			**X**
	Compuestos fenólicos			**X**
	Otros			
¿Se dispone de un mínimo de 15 datos de pH y /o de a_w correspondientes a tres lotes diferentes (n= 5/ lote) representativos de la producción?		**X**		
Se caracteriza la variabilidad intra e inter-lote de pH y / o a_w, y se estima que la probabilidad de que el pH y/o la a_w sean superiores al límite establecido en la nota 8 es inferior al 5% (es decir, existe una confianza estadística superior al 95% de que el pH y/o la a_w es inferior al límite establecido). - **pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92** - **pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94**			**X**	
Para los alimentos multicomponente (por ejemplo, un sándwich) estos valores se han calculado para cada uno de los componentes separados del producto una vez montado, esperando el tiempo suficiente, que se habrá registrado, para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes. Se ha considerado el componente más favorable para el crecimiento microbiano. No se deben calcular a partir de una muestra homogeneizada del producto completo.		**X**		

Se caracterizan otros factores intrínsecos o extrínsecos empleados para justificar la vida útil establecida (p.ej., concentración de aditivos).			**X**
La vida útil establecida es inferior a 5 días		**X**	
Conclusión: El alimento está correctamente caracterizado.	**X**		
Observaciones: Se ha identificado cuál es el componente con características más favorables al crecimiento de *Lm*.			
Conclusión: El operador puede justificar que pertenece a la categoría 1.3 de productos que no pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes* por pH/a_w (nota 8 Reglamento (CE) 2073/2005).		**X**	
Observaciones: Se deben aportar estudios complementarios para validar la vida útil asignada.			

Conclusión.

La empresa ha caracterizado correctamente su producto. El componente que presenta unas condiciones más favorables para el crecimiento de *L. monocytogenes* es la lechuga (valores iniciales: pH = 6,07 ± 0,04; a_w = 0,994 ± 0,003). Además, estos valores se han determinado una vez que el producto ha sido montado, separando los componentes tras esperar el tiempo suficiente para que se haya dado la interacción entre los componentes (pH = 6,00 ± 0,03; a_w = 0,986 ± 0,002 tras transcurrir un día de su vida útil).

Por lo tanto, para la realización de los estudios complementarios necesarios para validar la vida útil se deberá considerar que el ingrediente que presenta las características más favorables al crecimiento de Lm es la lechuga.

EJEMPLO 4 - BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA. QUESO FETA.

Planteamiento del ejemplo.

La empresa X quiere comercializar un queso tipo Feta fabricado a partir de leche de oveja pasteurizada y que se comercializa cortado en dados y envasado en bolsas de plástico.



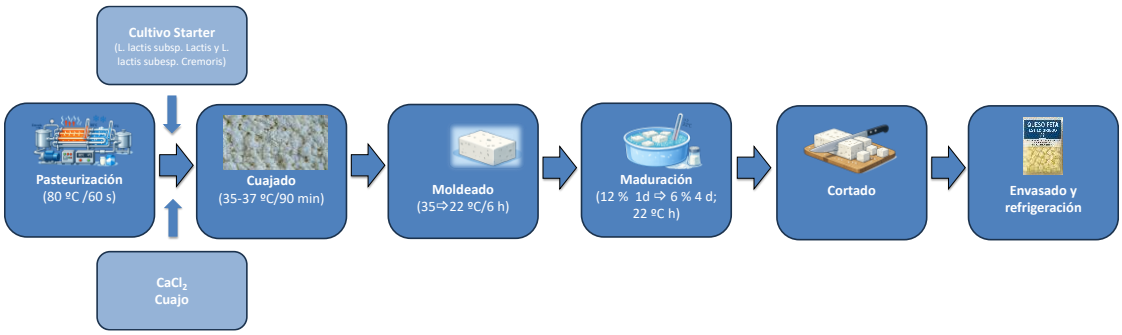
Para dicho producto propone una vida útil de 4 meses en refrigeración ("Conservar en frío entre 1 y 4 ºC").

La empresa indica que ha caracterizado ampliamente el producto y proporciona los datos de los tres lotes representativos (fabricados en condiciones idénticas a las que se usarán para los productos que quieren comercializar y de forma independiente -diferentes lotes de materias primas y días de producción-) cuyas características físico-químicas son las más favorables para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (tabla 1).

Tabla 1: Características físico-químicas de 3 lotes independientes de producción (los más favorables para el crecimiento de *L. monocytogenes*). Los valores indicados corresponden al promedio y desviación estándar (DE) de 5 determinaciones (cada una correspondiente a una unidad de muestreo independiente).

	Lote 20250201		Lote 20250208		Lote 20250304	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
pH	4,48	0,05	4,43	0,05	4,52	0,07
aw	0,946	0,002	0,952	0,002	0,948	0,010
Ácido láctico (%)	1,43	0,1	1,51	0,05	1,56	0,81

El proceso simplificado de producción de dicho producto es el siguiente:

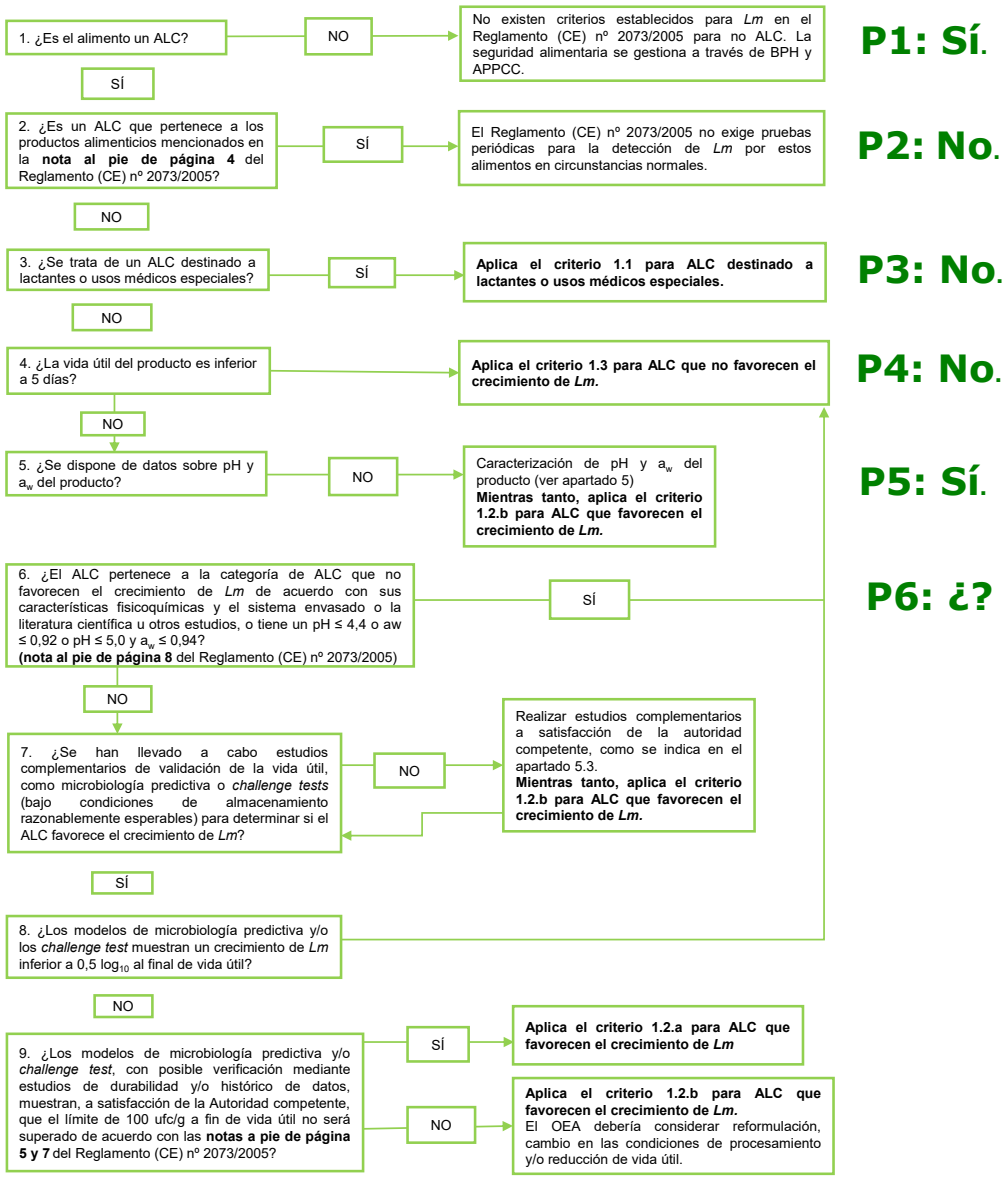


Como se describe en el diagrama, la leche de oveja se somete a un proceso de pasteurización (80 °C/ 60 segundos) y posteriormente se transfiere a una cuba de cuajado donde se le añaden el cuajo, cloruro sódico y los microorganismos estárter (en este caso un preparado comercial que incluye *Lactococcus lactis subesp. lactis* y *Lactococcus lactis subesp. cremoris*). El proceso de cuajado se desarrolla a 35-37 °C durante 90 minutos.

Inmediatamente después se procede a su moldeado, que se extiende unas 6 horas y en el que la temperatura baja de 37 °C a unos 22 °C. A este proceso le sigue la maduración en salmuera que se hace en dos fases. Una primera en un baño con el 12 % de cloruro sódico por un día y una segunda en un baño con el 6 % de cloruro sódico por cuatro días, en ambos casos a 22 °C.

El queso feta generado se corta en dados y se envasa con su salmuera y refrigerado, quedando así listo para su distribución.

Aplicación del árbol de decisiones.



Resolución del ejemplo

De acuerdo con los resultados de los análisis fisicoquímicos el alimento (queso feta) no posee ni pH ≤ 4,4, ni a_w ≤ 0,92 ni una combinación de ambos parámetros de pH < 5,0 y a_w ≤ 0,94. Sin embargo la empresa expone/argumenta que existe bibliografía consolidada que demuestra que en queso feta no sólo no es posible el crecimiento de *L. monocytogenes,* sino que lo que se produce es una inactivación progresiva de los microorganismos de esta especie.

Esta afirmación se sustenta en una revisión bibliográfica realizada por el responsable de calidad e I+D de la empresa, graduado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y con un máster en análisis microbiológico de los alimentos, en base a la cual se concluye que en el queso feta, como es el caso que se trata, no sólo que no es posible el crecimiento de *L. monocytogenes,* sino que, en la mayoría de los casos, lo que se produce es una inactivación progresiva de los microorganismos de esta especie. Las principales características de esta revisión se describen a continuación (Tabla 2).

Tabla 2: Características de la revisión bibliográfica desarrollada

Diseño	
Términos de búsqueda	"Feta cheese" AND ("Listeria monocytogenes" OR "L. monocytogenes)
Fuentes bibliográficas	SCOPUS y PUBMED
Campos de Búsqueda	Título, Resumen y palabras Clave
Idiomas	Inglés y Español
Fecha búsqueda	17/07/2025

Tabla 3: Criterios de inclusión empleado en la revisión bibliográfica.

Criterios de Inclusión	
Artículos originales (no revisiones ni capítulos de libro) en inglés o castellano	CI1
Artículos que estudian el crecimiento y/o supervivencia de ***L. monocytogenes*** en alimentos con características y condiciones de conservación comparables (y relevantes desde el punto de vista de la estimación de su vida útil) a las del alimento objeto de estudio (queso feta, ver tabla 1)	CI2
Artículos sin sesgos[8]	CI3

El informe indica que se encontraron 36 artículos a través de los dos buscadores (SCOPUS y PubMED), que se redujeron a 25 tras eliminar los duplicados. De ellos 3 se excluyeron por no cumplir con el Criterio de inclusión 1 (CI1) y 14 con el Criterio de Inclusión 2 (CI2). Ninguno se excluyó por no cumplir con el CI3.

Así, en base a estos criterios se consideraron relevantes los siguientes estudios:

- Erkmen O. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in Turkish White cheese during the ripening period (2000) Journal of Food Engineering, 46 (2), pp. 127 – 131. DOI: 10.1016/S0260-8774(00)00076-5

- Kaya N., Arslan Aydoğdu E.Ö., Kimiran A. Isolation and identification of *Listeria spp*. from white cheese samples presented for consumption in Istanbul (2021) Sakarya University Journal of Science, 25 (6), pp. 1253 – 126. DOI: 10.16984/saufenbilder.985810

- Ramsaran H., Chen J., Brunke B., Hill A., Griffiths M.W. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in soft cheeses (1998) Journal of Dairy Science, 81 (7), pp. 1810 - 1817 DOI: 10.3168/jds. S0022-0302(98)75750-9

[8] Tipos de Sesgos evaluados:
• Sesgo de selección. Ocurre cuando los individuos o grupos en un estudio difieren sistemáticamente de la población de interés, Incluye el sesgo que surge cuando existen diferencias sistemáticas entre las características iniciales de los grupos que se comparan.
• Sesgo de información medición). Sesgo que surge de diferencias sistemáticas en la recopilación, recuperación, registro o manejo de la información utilizada en un estudio. Incluye el causado por errores sistemáticos en la toma y/ análisis de datos.
• Sesgo de detección. Existencia de diferencias sistemáticas entre los grupos en la forma en cómo se determinaron los resultados.
• Sesgo de realización. Existencia de diferencias sistemáticas entre los grupos estudiados en cuanto a las condiciones aplicadas.
• Sesgo de publicación. Cuando la probabilidad de que un estudio sea publicado se ve afectada por sus hallazgos. Con frecuencia, los estudios con resultados positivos tienen más probabilidades de ser publicados que aquellos con resultados negativos o nulos.
Fuente: Catalogue of bias collaboration. Bankhead CR, Spencer EA, Nunan D. Information bias. In: Sackett Catalogue Of Biases 2019. https://catalogofbias.org/biases/information-bias/

- Konteles S., Sinanoglou V.J., Batrinou A., Sflomos K. Effects of γ-irradiation on *Listeria monocytogenes* population, colour, texture and sensory properties of Feta cheese during cold storage (2009) Food Microbiology, 26 (2), pp. 157 - 165 DOI: 10.1016/j.fm.2008.10.006

- Papadimitriou K., Anastasiou R., Georgalaki M., Bounenni R., Paximadaki A., Charmpi C., Alexandraki V., Kazou M., Tsakalidou E. Comparison of the microbiome of artisanal homemade and industrial Feta cheese through amplicon sequencing and shotgun metagenomics (2022) Microorganisms, 10 (5), art. no. 1073. DOI: 10.3390/microorganisms10051073.

- Papageorgiou D.K.,, Marth E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. J Food Prot. 1989 Feb;52(2):82-87. doi: 10.4315/0362-028X-52.2.82. PMID: 30991481.

- Genigeorgis C., Carniciu M., Dutulescu D., Farver T.B. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30°C. J Food Prot. 1991 Sep;54(9):662-668. doi: 10.4315/0362-028X-54.9.662. PMID: 31051570.

- Wemmenhove E., Wells-Bennik M.H.J., Zwietering M.H. A model to predict the fate of *Listeria monocytogenes* in different cheese types - A major role for undissociated lactic acid in addition to pH, water activity, and temperature. Int J Food Microbiol. 2021 Nov 2; 357:109350. Epub 2021 Jul 30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109350. PMID: 34455130.

Una vez extraídos los datos, el autor del informe indica que comprobó que los estudios de Kaya et al. (2021) y Papadimitiou et al. (2022) debían ser excluidos pues en ellos no se estudiaba la capacidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes*, tan sólo su presencia/ausencia (tabla 4).

Además, para establecer comparaciones y extraer conclusiones también excluyó el estudio de Genigeorgis et al. (1991) ya que el queso feta estudiado en dicho trabajo tenía un pH menor al producido por la empresa y, por lo tanto, el del estudio de Genigeorgis et al. sería más limitante para el crecimiento de *Listeria* que el producido por esta empresa (tabla 4).

Una vez excluidos dichos artículos el autor del informe concluyó lo siguiente:

-Todos los estudios coinciden en indicar que *L. monocytogenes* no sería capaz de crecer en el queso Feta a lo largo de su vida útil y en varios de ellos se indica que, incluso, se produciría una inactivación gradual de este microorganismo durante la maduración del mismo.

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

Además, en el informe se indica (y se ha verificado) que:

-Los estudios incluyen quesos con diferentes características físico-químicas (pH, a_w y concentración de ácido), utilizan diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* y evalúan diferentes temperaturas (incluyendo temperaturas de hasta 12 °C; ver tabla 4).

-Se puede considerar que el producto que la empresa quiere fabricar es análogo al descrito en la literatura científica pues su modo de fabricación es similar al descrito en los artículos y sus características físico-químicas están dentro del rango de las descritas en los artículos.

-Para dar más soporte a sus conclusiones el autor del informe indica que las conclusiones de la revisión sistemática son consistentes con las de los siguientes documentos que corresponden a una revisión y un challenge test que evalúan o discuten, particularmente, la capacidad de crecimiento de *Listeria* en queso feta.

- Bishop, J.R. and Smukowski, M. 2006. Storage temperatures necessary to maintain cheese safety. Food Protection Trends 26 (10): 714-724.

- Hunt, K.; Blanc, M.; Álvarez-Ordóñez, A.; Jordan, K. Challenge studies to determine the ability of foods to support the growth of *Listeria monocytogenes*. *Pathogens* **2018**, *7*, 80.

Finalmente, la tabla 4 resume las principales características de los estudios incluidos en la revisión y resultado: crecimiento, no crecimiento (D<0,5 log ufc/g) o inactivación. En la misma se señalan en verde las celdas que incluyen parámetros con valores comparables o más favorables para el crecimiento que los del queso de la empresa. Por el contrario, en rojo se incluye aquellos parámetros con valores más restrictivos para el crecimiento de *Listeria* (causa de exclusión del estudio).

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

Tabla 4: Tabla resumen que incluye las principales características de los estudios incluidos en la revisión y resultado: crecimiento, no crecimiento (<D0,5) o inactivación. Se incluyen las características del queso feta objeto de estudio.

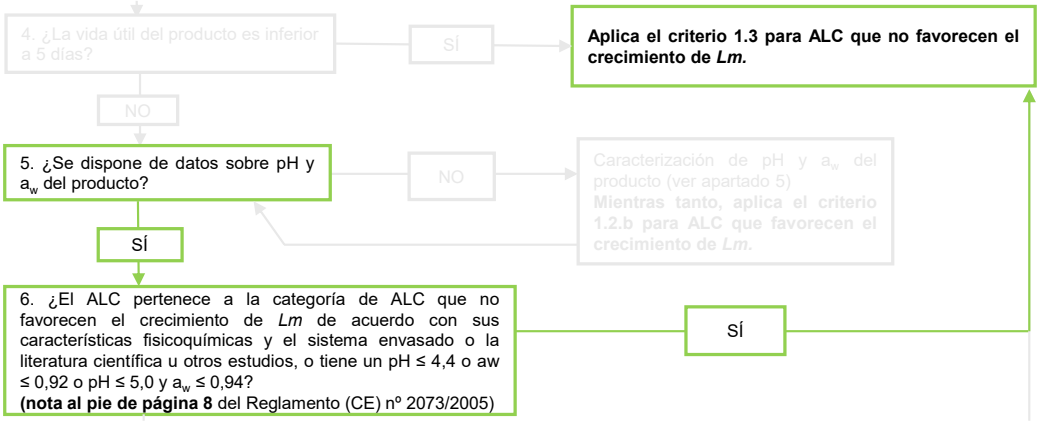
Estudio	Características del producto y condiciones de conservación estudiadas					¿Útil para determinar la capacidad de crecimiento de *Listeria*?	Evolución de *Listeria* durante la vida útil
	pH	a_w	% ácido láctico	Cepa de *Listeria inoculada*	Temperatura		
Erkmen, 2000	4,66-4,99(con starter) 5,80-5,98(sin starter)	NR	NR	KUEN 136 (tipo 4a)	4 °C	Sí	Inactivación
Kaya et al., 2021	NR	NR	NR	NA	Comerciales	No, no evalúa la capacidad de crecimiento de *Listeria*, sólo estudia presencia.	-
Ramsaran et al., 1998	~4,75-5,25	NR	NR	G. Stewart (University of Nottingham)	2 ± 1 °C	Sí	No crecimiento o inactivación
Konteles et al. 2009	4,55-4,58	NR (agua ~ 56,5%)		NCTC 10357	4 °C	Sí	No crecimiento (<D0,5)
Papadimitriou et al., 2022	NR	NR	NR	NA	Comerciales	No, no evalúa la capacidad de crecimiento de *Listeria*, sólo estudia presencia.	-
Papageorgiou y Marth, 1989	~4,00-4,50	0,974-0,977	NR	Scott A (tipo 4b) y California	4 °C	Sí	Inactivación
Genigeorgis et al., 1991	4,2-4,3	NR	NR	Scott A, V7, RM-1, VPH-1 y VPH-2	4-30 °C	No, pH inferior al del Feta objeto de estudio y capaz de inhibir por sí solo a *Listeria*.	Inactivación
Wemmenhove et al., 2021	4,5-4,8*	0,96*	1,47 %*	Varias	10 °C	Sí	No crecimiento o inactivación
Hunt et al., 2018	4,37-4,38	0,945-0,973	NR	Cepas 6179, 1020 y EUR LM 1382	8-12 °C	Sí	Inactivación
Queso Feta X	**4,43-4,52**	**0,946-0,952**	**1,43-1,56**	**NA**	**Comercial**	**NA**	**¿?**

NR: No reportado; NA: No Aplica.
*Estimados a partir de la bibliografía

Respuestas al listado de verificación

4. BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA. NOTA 8 REGLAMENTO (CE) 2073/2005		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
El informe está avalado por expertos y, en caso de haberse hecho por terceros, esto se indica específicamente.		**x**		
El informe describe la metodología de búsqueda, esta se ha realizado usando bases de datos reconocidas (Web of Science, Google Scholar, Scopus, PubMed, etc.).		**x**		
La selección de artículos se ha realizado minimizando la presencia de sesgos (ver apartado 5.2)		**x**		
Están identificadas correctamente las características intrínsecas y extrínsecas del producto y se demuestra que el producto tiene las mismas características que los de la bibliografía científica aportada. En caso contrario, se ha evaluado el efecto de las diversas características en la supervivencia y el crecimiento de *Lm*.		**x**		
Se justifica que el proceso de producción es similar a los de la bibliografía científica aportada.		**x**		
Se justifica que las condiciones de conservación (tiempo, temperatura y envasado) cubren las condiciones razonablemente previsibles del producto objeto de estudio (ver tabla 4 del documento de orientación).		**x**		
¿La bibliografía científica recoge resultados obtenidos con diferentes cepas de *Listeria monocytogenes que* refuercen la validez y la aplicabilidad de dichos resultados para los fines del estudio?		**x**		
Conclusión: Puede justificar que pertenece a la categoría 1.3 de productos que no pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes.*		**x**		
Observaciones:				

Respuesta al árbol de decisiones



Conclusión

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

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

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

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.3 Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo *de L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4) (8)	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

(8) Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con pH ≤ 4,4 o a w ≤ 0,92, productos con pH ≤ 5,0 y aw ≤ 0,94, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente*."

Es responsabilidad del operador verificar que los lotes producidos a partir de la verificación suficiente del estudio siguen cumpliendo el criterio para mantenerse en la categoría 1.3.

EJEMPLO 5 - JUSTIFICACIÓN DE CÁLCULO DE VIDA ÚTIL EN BASE A UN ESTUDIO COMPLEMENTARIO DE OTRO PRODUCTO. GAZPACHO.

Planteamiento del ejemplo

Una empresa comercializa diferentes productos basados en frutas y verduras. Ha extendido su línea de productos con nuevas recetas/formatos de gazpacho. Para establecer la vida útil de los nuevos productos, la empresa presenta una justificación del tiempo de vida útil basada en la comparación del nuevo producto con otro alimento con características similares (de procesado, características físico-químicas, envasado, etc.) que ya dispone de un estudio complementario de vida útil **verificado por la autoridad competente**.

La tabla a continuación resume los parámetros más relevantes del producto inicial con vida útil validada para este ejemplo:

Nombre:	Gazpacho andaluz
Ingredientes:	Tomate, pimiento, pepino, ajo, aceite, vinagre, 2 g de sal
Presentación:	Botella de plástico de 300 ml
pH:	4,7±0,1 (media ± DE[1])
Almacenamiento:	Refrigeración (2-5°C)
Vida útil	14 días

[1] DE: Desviación estándar

En un ensayo de desafío realizado en el *Gazpacho andaluz se obtuvo* un potencial de crecimiento (Δ) ≤ 0.5 log ufc/g *lo que* justifica su inclusión en la categoría 1.3, ya que no permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Se le asignó una vida útil de 14 días considerando las condiciones probables de almacenamiento y los niveles de contaminación esperables.

La empresa pretende utilizar este estudio de vida útil para justificar la misma vida útil (14 días) para su nueva línea de productos, cuyas características se analizan a continuación.

PRODUCTO 1: GAZPACHO DEL SUR. CAMBIO EN EL ENVASADO

Nombre:	Gazpacho del sur
Ingredientes:	Tomate, pimiento, pepino, ajo, aceite, vinagre, 2 g de sal
Presentación:	Tetrabrick de 300 ml
pH:	4,7±0,1
Almacenamiento:	Refrigeración (2-5°C)

Este producto presenta un cambio en el envasado, utilizando un tetrabrick en lugar de una botella de plástico. Se considera que el cambio:

- NO afecta a la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*
- NO afecta a las condiciones probables de almacenamiento
- NO afecta a los niveles de contaminación esperables

Por lo tanto, se concluye que el estudio complementario que justifica la vida útil (14 días) realizado para el *Gazpacho Andaluz* **SÍ** puede ser aplicable al nuevo producto *Gazpacho del sur*.

PRODUCTO 2: GAZPACHO DEL ESTE. CAMBIO EN LA COMPOSICIÓN DE GASES DEL ENVASADO

Nombre:	Gazpacho del este
Ingredientes:	Tomate, pimiento, pepino, ajo, aceite, vinagre, 2 g de sal
Presentación:	Botella de plástico de 300 ml; envasado en atmósfera modificada (CO_2)
pH:	4,7±0,1
Almacenamiento:	Refrigeración (2-5°C)

Este producto se envasa en atmósfera modificada. Se considera que el cambio:

- SÍ puede afectar a la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. Se espera que la presencia de CO_2 no favorezca el crecimiento de *L. monocytogenes* en comparación con el envasado sin atmósfera modificada.
- NO afecta a las condiciones probables de almacenamiento
- NO afecta a los niveles de contaminación esperables

Por lo tanto, se concluye que el cálculo de vida útil (14 días) realizado para el *Gazpacho Andaluz* **SÍ** puede ser aplicable al *Gazpacho del este*. De hecho, se considera una estimación conservadora, debido al posible efecto inhibitorio de la atmósfera modificada.

PRODUCTO 3: GAZPACHO FIT. DISMINUCIÓN DE UN INGREDIENTE QUE PUEDE AFECTAR A LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Lm*

Nombre:	Gazpacho fit
Ingredientes:	Tomate, pimiento, pepino, aceite, vinagre, 1 g de sal (reducción del 50%)
Presentación:	Botella de plástico de 300 ml
pH:	4,7±0,1
Almacenamiento:	Refrigeración (2-5°C)

Este producto presenta un cambio de receta, reduciendo la cantidad de sal. Se considera que esto:

- La disminución de la sal a la mitad, **PODRÍA** afectar a la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. La sal ejerce un efecto inhibitorio, por lo que su reducción podría permitir el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- NO afecta a las condiciones probables de almacenamiento
- NO afecta a los niveles de contaminación esperables

Por lo tanto, se concluye que el estudio complementario aprobado que justifica la vida útil (14 días) realizado para el *Gazpacho Andaluz* **NO** es aplicable al nuevo producto *Gazpacho fit*. Por lo tanto, se recomienda realizar un estudio complementario específico para este nuevo producto que posee unas condiciones más favorables para el crecimiento de *L.m.*

PRODUCTO 4: GAZPACHO AQUITAINE. ADICIÓN DE UN INGREDIENTE QUE PUEDE AFECTAR A LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Lm*

Nombre:	Gazpacho Aquitaine
Ingredientes:	Tomate, pimiento, pepino, aceite, vinagre, 2 g de sal, menta
Presentación:	Botella de plástico de 300 ml

pH:	4,7±0,1
Almacenamiento:	Refrigeración (2-5°C)

Este producto presenta un cambio de receta, introduciendo menta como nuevo ingrediente. Se considera que esto:

- PODRÍA afectar a la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. La menta, de acuerdo con la bibliografía científica, tiene propiedades antimicrobianas, por lo que su inclusión en el producto podría ejercer un efecto inhibitorio en la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. En todo caso, el operador controla mediante buenas prácticas de higiene que la adición de este nuevo ingrediente no supone mayor contaminación inicial ni favorece el crecimiento de *Lm*.
- NO afecta a las condiciones probables de almacenamiento
- NO afecta a los niveles de contaminación esperables

Por lo tanto, se concluye que el estudio complementario aprobado que justifica la vida útil (14 días) realizado para el *Gazpacho Andaluz* **SÍ** es aplicable al nuevo producto *Gazpacho Aquitaine* porque el nuevo ingrediente no justifica tener impacto en el crecimiento de Lm.

PRODUCTO 5: GAZPACHO MURCIANO. CAMBIOS EN PH DEL PRODUCTO FINAL

Nombre:	Gazpacho Murciano
Ingredientes:	Tomate (cherry), pimiento (de bola), pepino, aceite, vinagre, 2 g de sal
Presentación:	Botella de plástico de 300 ml
pH:	5,1±0,1
Almacenamiento:	Refrigeración (2-5ºC)

Este producto presenta un cambio de receta, utilizando diferentes variedades de tomate y pimiento, lo que resulta en un cambio en el pH del producto. Se considera que esto:

- SÍ afecta a la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. La subida de pH podría aumentar la cinética de crecimiento del microorganismo.
- NO afecta a las condiciones probables de almacenamiento
- Podría afectar a los niveles de contaminación esperables por el uso de nuevos ingredientes.

Por lo tanto, se concluye que el cálculo de vida útil (14 días) realizado para el *Gazpacho Andaluz* **NO** es aplicable al nuevo producto *Gazpacho Murciano*, ya que un aumento en la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* reduciría el tiempo requerido para alcanzar 100 UFC/g. Por lo tanto, se recomienda realizar un estudio complementario para la nueva receta, el cual también debería considerar los posibles cambios en los niveles de contaminación por la utilización de nuevos ingredientes.

PRODUCTO 6: GAZPACHO GOURMET. CAMBIOS EN RECETA Y PH DEL PRODUCTO FINAL

Nombre:	Gazpacho Gourmet
Ingredientes:	Tomate (cherry), pimiento (de bola), pepino, aceite, vinagre, 2 g de sal, menta
Presentación:	Botella de plástico de 300 ml
pH:	5,1±0,1
Almacenamiento:	Refrigeración (2-5°C)

Este producto presenta un cambio de receta, introduciendo diferentes variedades de tomate y pimiento, y menta como nuevo ingrediente. Además, un cambio en el método de producción ha resultado en un incremento del pH. Se considera que esto:

- PODRÍA afectar a la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. La menta, de acuerdo con la bibliografía científica, tiene propiedades antimicrobianas, por la que su inclusión en el producto podría ejercer un efecto inhibitorio en la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. Por otro lado, un incremento en el pH tendría el efecto opuesto, aumentando la cinética de crecimiento del microorganismo.
- NO afecta a las condiciones probables de almacenamiento
- Podría afectar a los niveles de contaminación esperables por el uso de nuevos ingredientes.

Por lo tanto, se concluye que el cálculo de vida útil (14 días) realizado para el *Gazpacho Andaluz* **NO** es aplicable al nuevo producto *Gazpacho Gourmet*. El aumento del pH y la introducción de la menta tienen un efecto opuesto en la cinética del microorganismo, por lo–que no es posible conocer el efecto neto. Por lo tanto, no se puede conocer de antemano el tiempo requerido para que *L. monocytogenes* alcance 100 UFC/g. Así que se recomienda realizar un estudio complementario para la nueva receta, el cual debería considerar también los posibles cambios en los niveles de contaminación por la utilización de nuevos ingredientes.

PRODUCTO 7: GAZPACHO ARTESANO. USO DE INGREDIENTES NO ESTANDARIZADOS Y CAMBIOS EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN.

Nombre:	Gazpacho artesano
Ingredientes:	Tomate, pimiento, pepino, ajo, aceite, vinagre, 2 g de sal
Presentación:	Botella de plástico de 300 ml
pH:	4,5±0,3
Almacenamiento:	Refrigeración (2-5°C)

Este producto presenta un cambio en los ingredientes utilizados (tomate, pepino y pimiento de distintas variedades, grado de maduración, contenido en agua, etc., en función de la disponibilidad en el mercado) y en el modo de elaboración (menor homogeneización), lo que resulta en una mayor variabilidad en el pH del producto final. Se considera que esto:

- SÍ afectará a la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*, ya que ésta se ve afectada por el pH del medio.
- NO afecta a las condiciones probables de almacenamiento
- NO afecta a los niveles de contaminación esperables

Por lo tanto, se concluye que el estudio complementario inicial que justifica la vida útil (14 días) realizado para el *Gazpacho Andaluz* **NO** es aplicable al nuevo producto *Gazpacho artesano*. Los ensayos de desafío deben representar el caso más desfavorable. Aunque el *Gazpacho artesano* tenga un pH medio inferior, su mayor variabilidad puede resultar en escenarios de un pH superior al *Gazpacho Andaluz*. Por lo tanto, se recomienda realizar un estudio complementario del nuevo producto que permita justificar el impacto de la variabilidad en el crecimiento de Lm.

PRODUCTO 8: GAZPACHO RESTAURACIÓN. CAMBIO EN LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Nombre:	Gazpacho restauración

Ingredientes:	Tomate, pimiento, pepino, ajo, aceite, vinagre, 2 g de sal
Presentación:	Botella de plástico de 300 mL;
pH:	4,7±0,1
Almacenamiento:	Refrigeración (2-4°C)
Población de destino	Público en general, pero uso restringido a personal profesional (restauración colectiva). No estará disponible directamente para el consumidor final.

Este producto presenta un cambio en el canal de comercialización que afecta a las condiciones del almacenamiento. En lugar del consumidor general, este nuevo producto *Gazpacho restauración* sólo se utiliza para una cadena de restauración propia de la empresa para uso por profesionales de la restauración. En este caso, la empresa es capaz de garantizar que la temperatura se mantendrá entre 2 y 4°C durante toda la vida útil del producto. Se considera que esto:

- SÍ afectará a la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. El reducir la temperatura máxima de almacenamiento inhibirá el crecimiento posible del microorganismo.
- NO afecta a las condiciones probables de almacenamiento
- NO afecta a los niveles de contaminación esperables

Por lo tanto, se concluye que el estudio complementario que justifica la vida útil (14 días) realizado para el *Gazpacho Andaluz* **SI** es aplicable para al nuevo producto *Gazpacho restauración.* De hecho, se considera una estimación conservadora, debido al efecto inhibitorio del mejor control de la cadena de frío.

EJEMPLO 6 - MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA. QUESO COTTAGE.

El operador X fabrica un queso cottage hecho a partir de leche de vaca pasteurizada que quiere comercializar en envases de plástico de 250 gramos y con la siguiente vida útil y recomendación de temperatura de conservación:



Vida útil	21 días
Temperatura de conservación	< 5ºC

De acuerdo con los ensayos que ha realizado en diferentes lotes, presenta a continuación los datos de los tres lotes con parámetros más favorables para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Tabla 1).

Tabla 1: Características físico-químicas de 3 lotes independientes de producción (los más favorables para el crecimiento de *Lm*). Los valores indicados corresponden al promedio y desviación estándar (DE) de 5 determinaciones (cada una correspondiente a una unidad de muestreo independiente).

	Lote 20240807		Lote 20230430		Lote 20250103	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
pH	4,87	0,04	4,81	0,07	4,84	0,05
Residuo seco (%)	28	1,20	27	0,81	29	1,41
Ácido láctico (ppm)	850	15	824	54	805	75
NaCl (%)	1,75	0,13	1,81	0,12	1,64	0,06

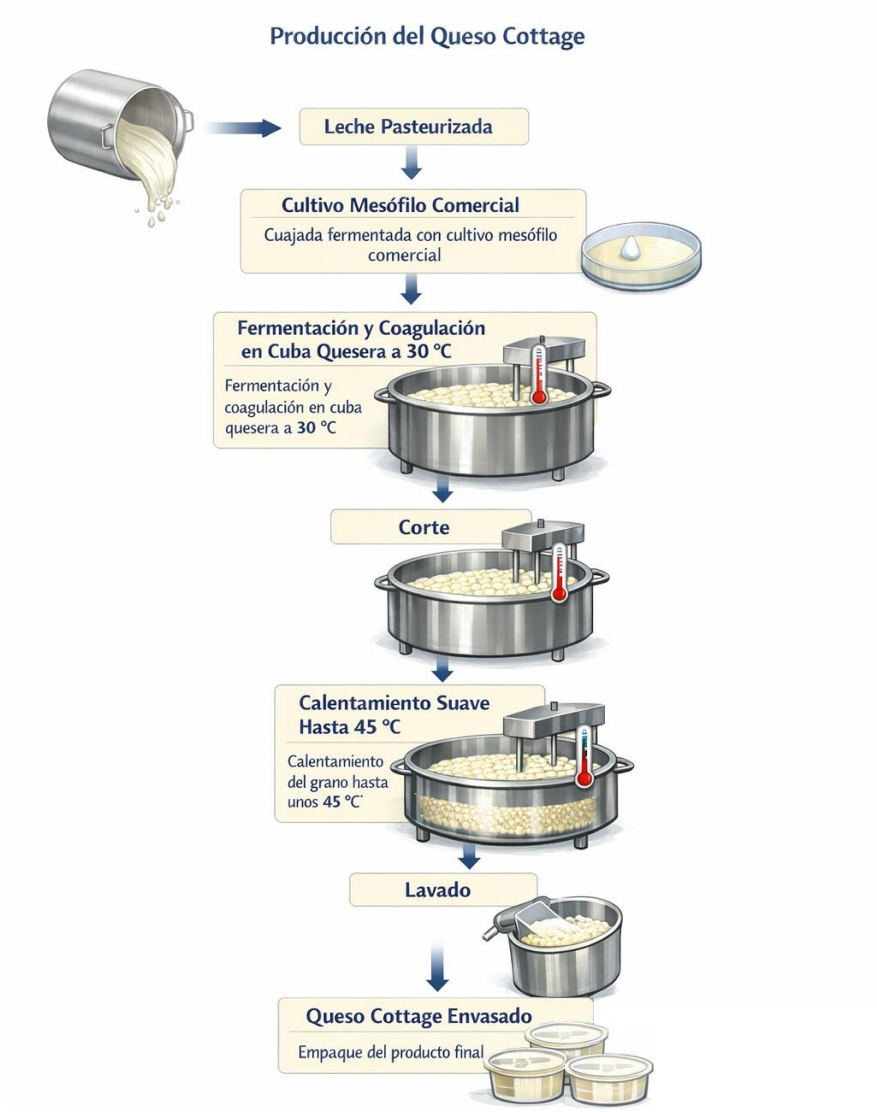
De la misma forma, y según los registros de la empresa, que realiza el análisis del producto recién terminado y de las superficies de trabajo y corte, en ninguno de los lotes de queso analizados en los últimos 2 años (un total de 80 lotes) se ha observado la presencia de *Lm* y tan solo en una ocasión se detectó la presencia en las superficies de corte. La empresa en su momento revisó y mejoró el proceso de producción, de acuerdo con los principios APPCC, no habiéndose detectado de nuevo la presencia de *Lm* en los análisis posteriores.

Proceso de fabricación

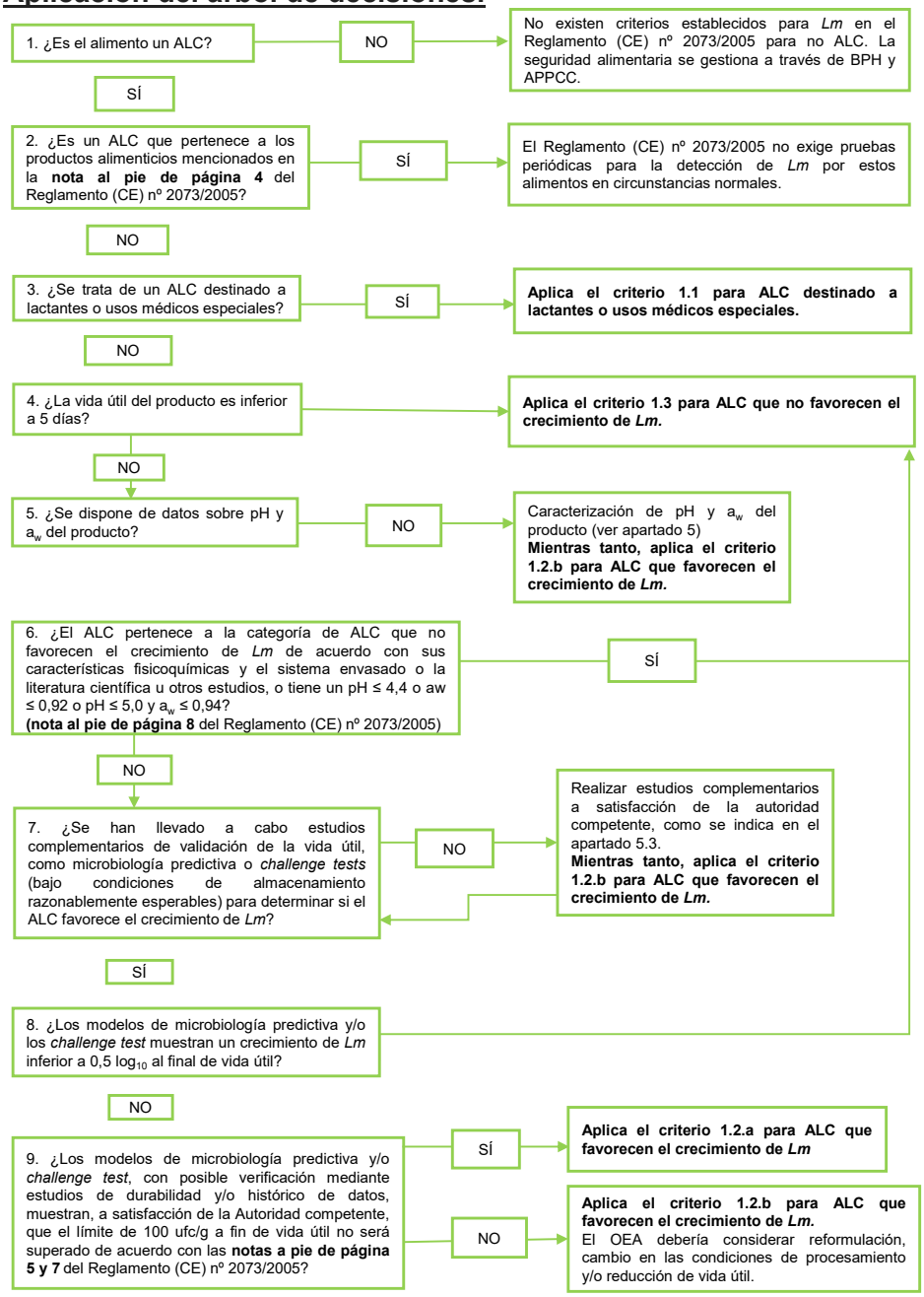
El proceso simplificado de producción de dicho producto es el siguiente:

La leche de vaca se somete a un proceso de pasteurización (80 °C/ 60 segundos) y posteriormente se transfiere a una cuba de fermentación y cuajado a 30 °C donde en primer lugar se añade el cultivo starter (en este caso un cultivo mesófilo compuesto por *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, R604, Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Dinamarca) a una concentración de 10^6 UFC/mL) y posteriormente el cuajo.

Una vez se empieza a producir el cuajado se aumenta la temperatura hasta los 45 °C para mejorar el desuerado y conseguir la textura adecuada. Para enfriar, eliminar el lactosuero y frenar la fermentación los granos de queso se someten a un proceso de lavado intensivo y, posteriormente, se envasan en el formato comercial correspondiente y se mantiene en refrigeración hasta su distribución.



Aplicación del árbol de decisiones.



Resolución del ejemplo

Para justificar la vida útil propuesta el operador presentó el siguiente estudio de microbiología predictiva. Para ello, indicó que su estimación se basaba en el uso del programa Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP; http://fssp.food.dtu.dk/) en el que existe un modelo específico para este tipo de queso.

Los parámetros introducidos en el modelo fueron los siguientes:

-Nº inicial: 1 UFC/gramo (un escenario muy conservador considerando los resultados de su histórico que indican que ningún lote/muestra de los estudiados se ha detectado *Lm* en 25 gramos)[9].

-10^4 UFC/mL de bacterias ácido-lácticas (100 veces menos de las que se inoculan y siempre teniendo en cuenta que las que se usan en producto y con las que se ha construido el modelo son las mismas).

-Temperatura 7 °C (dos grados por encima de las recomendadas para la conservación de este queso).

-pH: 5,0 (0,1 unidades de pH por encima del valor del lote con pH más elevado).

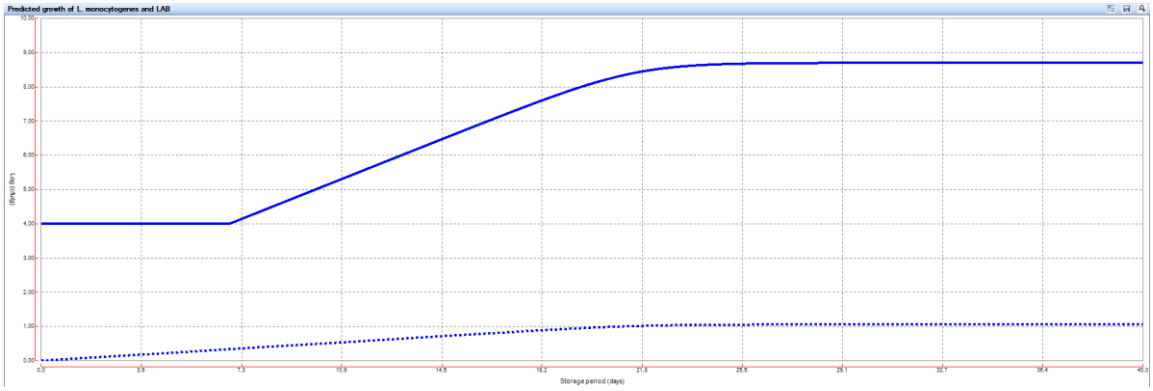
-700 ppm de ácido láctico. Un valor inferior en 100 ppm al del lote con menor concentración.

-1,5 % NaCl (un valor un 0,14 % inferior al del lote con menor concentración de NaCl)

-Un 25 % de materia seca (un 2% inferior al del lote con menor materia seca[10]).

-Modelo con el peor escenario de fase de latencia para *Lm* (es decir, sin fase de latencia o fase de latencia = 0).

Introduciendo estos parámetros en el modelo se obtiene la siguiente curva en la que en azul y línea continua aparecen los recuentos de bacterias ácido lácticas y en línea discontinua los de *Lm*. Como se puede observar, *Lm* es capaz de crecer en este producto y en las condiciones de conservación propuestas pero sus recuentos se mantienen por debajo de las 100 UFC/gramo hasta los 40 días, 19 más de la vida útil propuesta.



[9] En caso de que la empresa disponga de evidencias documentadas (por ejemplo, un amplio histórico de resultados de análisis de producto terminado, suficiente y representativo), y siempre que dicha decisión esté técnicamente justificada, podrían emplearse en el modelo parámetros menos conservadores, es decir, más desfavorables para el crecimiento de *Listeria* (por ejemplo, concentraciones iniciales más bajas). Además, se tendrán en cuenta también los resultados de análisis de materias primas, superficies, etc. así como todos los resultados de control oficial. Esta justificación técnica deberá estar documentada en el marco del estudio de vida útil.

[10] Este valor es relevante ya que cuanta menor materia seca, menor es la concentración efectiva de los agentes microbianos en la fase acuosa.

Además, hay que señalar que el modelo utilizado es un modelo validado en este alimento en concreto (Østergaard et al., 2014[11]), quedando las características del producto dentro de los rangos de parámetros estudiados (en los que la predicción sería válida) y que para su construcción se usaron distintas cepas (4) de *Lm* bien aisladas de entornos de producción láctea o implicadas en brotes relacionados con productos lácteos.

Por último, hay que señalar que para hacer la predicción de la vida útil no sólo se usó el peor escenario posible, sino que, además, la empresa fue conservadora, usando valores/parámetros para hacer las predicciones incluso más favorables para el crecimiento de *Lm* que su peor escenario posible (los determinados para el lote con las características más favorables para el crecimiento de este microorganismo). Esta aproximación refuerza la validez de la vida útil estimada y resulta especialmente adecuada en aquellos casos en los que el ALC permite o soporta el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Conclusión

Si bien todo lo arriba indicado sugiere que la vida útil estimada por la empresa sería válida si se cumplieran las condiciones de conservación indicadas por la misma (< 5 °C) este estudio de microbiología predictiva, y por lo tanto la vida útil propuesta debería ser calificado como **NO SUFICIENTE** ya que el estudio no tiene en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso del alimento (la empresa podría justificar una temperatura de almacenamiento de 7 °C en sus cámaras -si aporta la documentación pertinente- para la primera parte de la vida útil pero, para el resto de la vida útil, incluidos el transporte, distribución en puntos de venta y almacenamiento por parte del consumidor es muy difícil que se mantenga esta temperatura y habría que considerar otras).

Respuestas al listado de verificación

5. ALC QUE PUEDEN FAVORECER EL CRECIMIENTO DE *Lm* ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS				
5.1. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
El informe está avalado por expertos y, en caso de haberse hecho por terceros, esto se indica específicamente.				**X**
El informe describe claramente el objetivo del estudio		**X**		
El informe parte de una caracterización adecuada del alimento (ver listado de verificación 1)		**X**		
Se indica la estrategia de búsqueda, criterios de selección y fuente de los modelos seleccionados (FSSP, Pathogen Modelling Programme, MicroHibro…).		**X**		
Se describe el modelo seleccionado		**X**		
Se comprueba que el producto está dentro del rango de validez del modelo.		**X**		
	Se justifican los parámetros introducidos (pH, a_w, conservantes,	**X**		

[11] Østergaard, N.B., Eklöw, A., Dalgaard, P. (2014). Modelling the effect of lactic acid bacteria from starter- and aroma culture on growth of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 15-25.

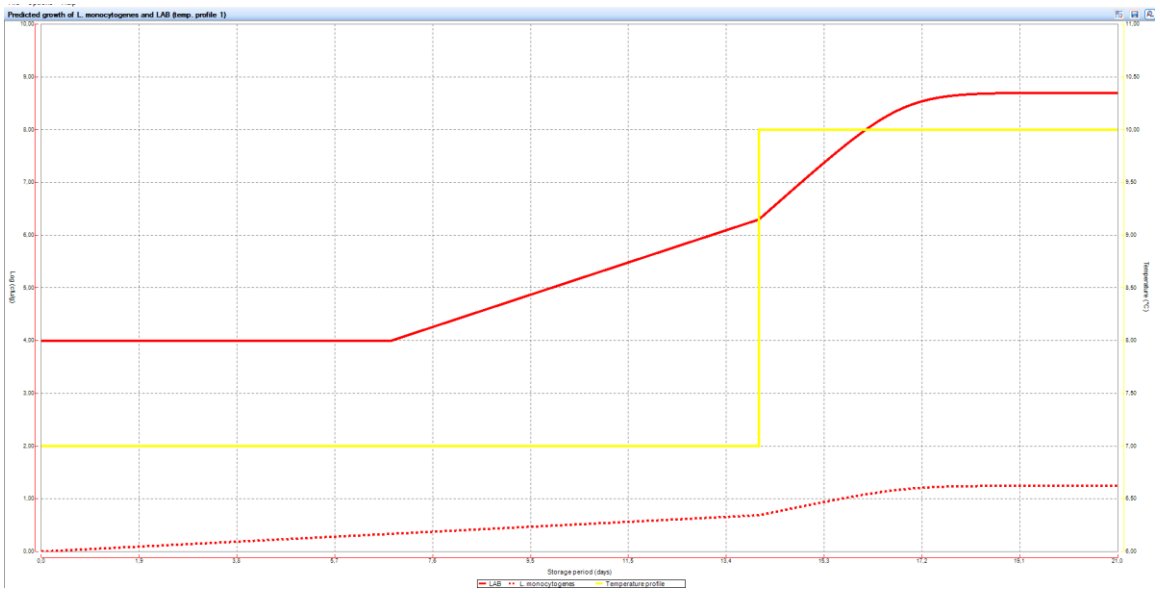
Se describen las condiciones de la simulación	etc.) (ver apartado 5.3.1 Selección del peor escenario posible)			
	Se justifica la concentración inicial de Lm introducida en el modelo (de manera general, un escenario conservador es partir de una concentración inicial de 1 ufc/g)	**X**		
	Se definen temperaturas de simulación, que cubren las condiciones razonablemente previsibles de conservación del producto objeto de estudio (tabla 4 del documento de orientación).		**X**	
	Se considera que la fase de latencia es cero (escenario conservador)	**X**		
El modelo ha sido validado con cepas diferentes a las que se utilizaron en su elaboración o ha sido elaborado utilizando un cóctel de cepas de *Listeria monocytogenes.*		**X**		
Se considera la variabilidad asociada a las diferencias de procesado, de las características del alimento y de las condiciones de almacenamiento.		**X**		
Presentación de resultados	Se presentan probabilidades de crecimiento.		**X**	
	Se presentan curvas de crecimiento	**X**		
	Se calcula el potencial de crecimiento		**X**	
	Se presentan gráficas comparativas por producto, en caso de incluirse varios productos en el estudio			**X**
	Se clasifica el producto en función de si favorece o no el crecimiento de Lm	**X**		
Presentación de las conclusiones del informe	Indica las suposiciones y/o datos de partida sobre las que se basan las conclusiones	**X**		
	Indica los resultados de la simulación y cualquier otro dato, incluido bibliográfico, empleados en la sustentación de las conclusiones	**X**		
	La vida útil propuesta está justificada por los resultados.		**X**	
<u>Conclusión:</u>	**¿El estudio de microbiología predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran, con probabilidad de crecimiento menor del 10%, que el producto no favorece el crecimiento de *Lm*?** En caso negativo, indicar motivos en observaciones		**X**	
	¿El estudio de microbiología predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias		**X**	

	que demuestran de manera satisfactoria que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil? En caso negativo, indicar motivos en observaciones			
Observaciones:				

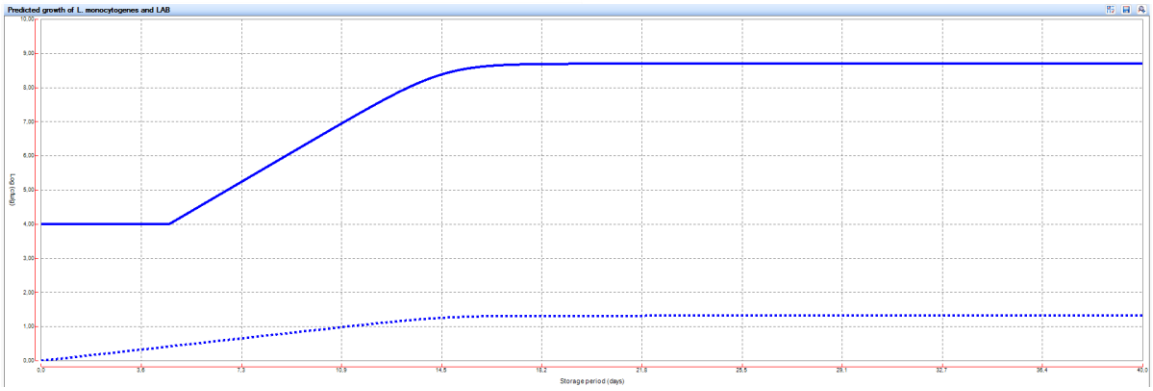
CONTINUACIÓN DEL EJEMPLO

A la vista de lo arriba indicado la empresa realiza otros nuevos estudios, usando el mismo modelo arriba propuesto pero, en este caso, considerando un perfil de temperaturas dinámico, con dos tercios de la vida útil (14 días) a 7 °C y un tercio (7 días) a 10 °C, conforme a lo indicado en el Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (Tabla 4). El resto de parámetros del modelo son los mismos que los arriba indicados.

La gráfica que se muestra a continuación ilustra el resultado obtenido. En ella se incluye el perfil de temperaturas en amarillo, los recuentos de bacterias ácido lácticas (línea roja continua) y de *Lm* (Línea roja discontinua). Como puede observarse, en estas condiciones y tras 21 días *Listeria* no alcanzaría las 100 UFC/gramo.



No obstante, dado que el cultivo starter utilizado es mesófilo, esto implica que en condiciones de refrigeración *Lm* podría presentar ventajas de crecimiento y, por lo tanto, es necesario verificar que, a temperaturas de refrigeración, tras 21 días de conservación, los recuentos de *Lm* siguen sin superar el límite establecido (100 UFC/g). Esto ya se había constatado a través del primer estudio (a 5 °C), pero para confirmarlo la empresa también presenta los resultados de la predicción de crecimiento a 8 °C, que es la temperatura que, de acuerdo a la guía se debe usar para los ensayos de desafío en productos que contengan bacterias ácido lácticas (bacterias ácido lácticas: azul y línea continua; *Lm*: azul y línea discontinua. Como se observa en la figura, los resultados obtenidos confirman que tampoco en estas condiciones *Lm* alcanzaría las 100 UFC/gramo en el tiempo establecido.



Respuesta al árbol de decisiones

1. ¿Es el alimento un ALC?

SÍ

2. ¿Es un ALC que pertenece a los productos alimenticios mencionados en la **nota al pie de página 4** del Reglamento (CE) nº 2073/2005?

NO

3. ¿Se trata de un ALC destinado a lactantes o usos médicos especiales?

NO

4. ¿La vida útil del producto es inferior a 5 días?

NO

5. ¿Se dispone de datos sobre pH y a_w del producto?

SÍ

6. ¿El ALC pertenece a la categoría de ALC que no favorecen el crecimiento de *Lm* de acuerdo con sus características fisicoquímicas y el sistema envasado o la literatura científica u otros estudios, o tiene un pH ≤ 4,4 o aw ≤ 0,92 o pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94?
(nota al pie de página 8 del Reglamento (CE) nº 2073/2005)

NO

7. ¿Se han llevado a cabo estudios complementarios de validación de la vida útil, como microbiología predictiva o *challenge tests* (bajo condiciones de almacenamiento razonablemente esperables) para determinar si el ALC favorece el crecimiento de *Lm*?

SÍ

8. ¿Los modelos de microbiología predictiva y/o los *challenge test* muestran un crecimiento de *Lm* inferior a 0,5 $\log_{10}$ al final de vida útil?

NO

9. ¿Los modelos de microbiología predictiva y/o *challenge test*, con posible verificación mediante estudios de durabilidad y/o histórico de datos, muestran, a satisfacción de la Autoridad competente, que el límite de 100 ufc/g a fin de vida útil no será superado de acuerdo con las **notas a pie de página 5 y 7** del Reglamento (CE) nº 2073/2005?

SÍ → **Aplica el criterio 1.2.a para ALC que favorecen el crecimiento de *Lm***

Conclusión

Se concluye que la empresa ha proporcionado evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria de *Listeria monocytogenes* que le es de aplicación durante toda su vida útil (1.2), y el resultado de la verificación es **SUFICIENTE.**

Respuestas al listado de verificación

5. ALC QUE PUEDEN FAVORECER EL CRECIMIENTO DE *L.m.* ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS				
5.1. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA		**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
El informe está avalado por expertos y, en caso de haberse hecho por terceros, esto se indica específicamente.				**X**
El informe describe claramente el objetivo del estudio		**X**		
El informe parte de una caracterización adecuada del alimento (ver listado de verificación 1)		**X**		
Se indica la estrategia de búsqueda, criterios de selección y fuente de los modelos seleccionados (FSSP, Pathogen Modelling Programme, MicroHibro…).		**X**		
Se describe el modelo seleccionado		**X**		
Se comprueba que el producto está dentro del rango de validez del modelo.		**X**		
Se describen las condiciones de la simulación	Se justifican los parámetros introducidos (pH, a_w, conservantes, etc.) (ver apartado 5.3.1 Selección del peor escenario posible)	**X**		
	Se justifica la concentración inicial de Lm introducida en el modelo (de manera general, un escenario conservador es partir de una concentración inicial de 1 ufc/g)	**X**		
	Se definen temperaturas de simulación, que cubren las condiciones razonablemente previsibles de conservación del producto objeto de estudio (tabla 4 del documento de orientación).	**X**		
	Se considera que la fase de latencia es cero (escenario conservador)	**X**		
El modelo ha sido validado con cepas diferentes a las que se utilizaron en su elaboración o ha sido elaborado utilizando un cóctel de cepas de *Listeria monocytogenes.*		**X**		
Se considera la variabilidad asociada a las diferencias de procesado, de las características del alimento y de las condiciones de almacenamiento.		**X**		
Presentación de resultados	Se presentan probabilidades de crecimiento.		**X**	
	Se presentan curvas de crecimiento	**X**		
	Se calcula el potencial de crecimiento		**X**	
	Se presentan gráficas comparativas por producto, en caso de incluirse varios productos en el estudio			**X**

	Se clasifica el producto en función de si favorece o no el crecimiento de Lm	**X**		
Presentación de las conclusiones del informe	Indica las suposiciones y/o datos de partida sobre las que se basan las conclusiones	**X**		
	Indica los resultados de la simulación y cualquier otro dato, incluido bibliográfico, empleados en la sustentación de las conclusiones	**X**		
	La vida útil propuesta está justificada por los resultados.	**X**		
Conclusión:	**¿El estudio de microbiología predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran, con probabilidad de crecimiento menor del 10%, que el producto no favorece el crecimiento de *Lm*?** En caso negativo, indicar motivos en observaciones	**X**		
	¿El estudio de microbiología predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil? En caso negativo, indicar motivos en observaciones	**X**		
Observaciones:				

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

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

Categoría de alimentos	Microorganis - mos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.2. Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g (*)		EN/ISO 11290-2 (**)	Productos comercializados durante su vida útil

(*) Este criterio se aplica si el explotador de la empresa alimentaria que los haya producido ha podido demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el nivel de *Listeria monocytogenes* no superará el límite de 100 ufc/g durante la vida útil del alimento. El explotador

podrá fijar límites intermedios durante el proceso que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil del alimento.

(**) Sobre una placa de Petri de 140 mm de diámetro o tres placas de Petri de 90 mm de diámetro se siembra 1 ml de inóculo.

EJEMPLO 7- ENSAYO DE DESAFÍO PARA DETERMINACIÓN DE POTENCIAL DE CRECIMIENTO. ENSALADILLA RUSA.

Planteamiento del ejemplo.

El operador X fabrica ensaladilla rusa lista para el consumo para su comercialización en envase plástico de 500 gramos, envasado al vacío, con la siguiente vida útil y recomendación de temperatura de conservación:

Ficha técnica- Caracterización del producto

Producto	**Ensaladilla rusa**
Vida útil propuesta	**21 días**
Conservación	**3-6ºC**
Modo de empleo	**Una vez abierto el envase consumir en 48h**
Presentación	**Unidades de 500 g de peso, envasado al vacío, para distribución por canal HORECA**
Ingredientes	**Patata cocida (48 %), mayonesa (25 %), zanahoria cocida (9 %), atún (8 %), guisantes (5 %), huevo cocido (3 %) y aceitunas verdes (2 %). La formulación de la mayonesa incluye aceite vegetal, yema de huevo pasteurizada, vinagre, sal, azúcar, almidón modificado (E1422), goma xantana (E415), sorbato potásico (E202) y benzoato sódico (E211).**
Elaboración	**Todos los ingredientes (salvo los guisantes) son triturados (tamaño < 0,5 cm^3) y mezclados íntimamente.**

Debido al pequeño tamaño de los trozos, y a la mezcla íntima de los componentes, se produce una interacción entre los mismos, de modo que se alcanza un equilibrio muy rápido de sus parámetros fisicoquímicos. Por este motivo se considera que el alimento es homogéneo.

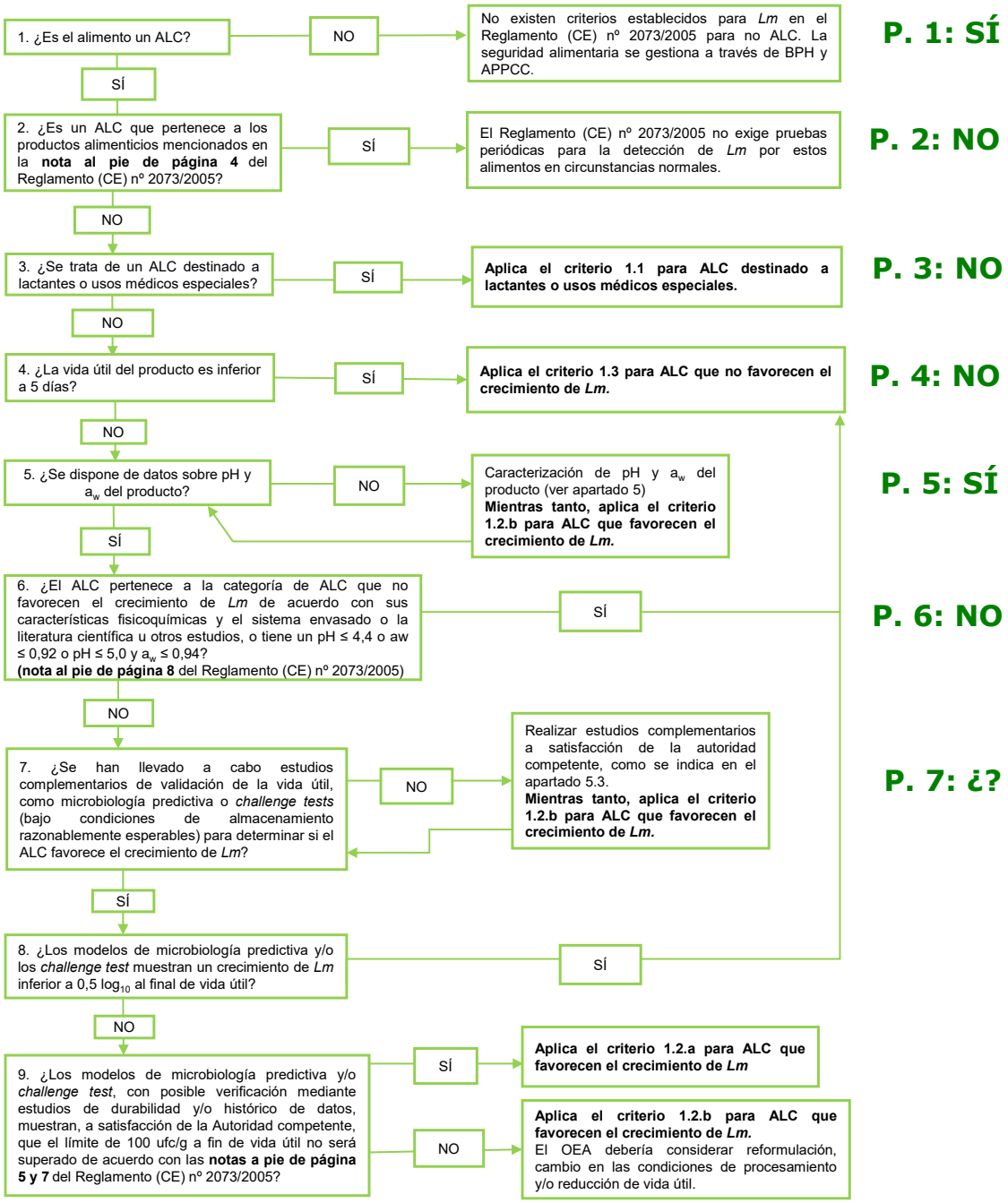
El operador presenta datos históricos de pH y a_w correspondientes a un número superior a 20 datos independientes (diferentes lotes de materias primas y días de producción)[12] de 3 años de producción, con las siguientes características:

	Valor medio	Desviación estándar	Percentil 5	Percentil 95
pH	5,49	0,12	5,30	5,68
a_w	0,990	0,003	0,985	0,995

[12]Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, AESAN, 2026

El operador presenta los registros de verificación tanto de las pesadas de aditivos añadidos al producto como de la concentración en producto final, que demuestran unas concentraciones de sorbato potásico (E202) de 300 mg/kg y de benzoato sódico (E211) de 250 mg/kg

Aplicación del árbol de decisiones



Resolución del ejemplo.

El operador presenta los resultados de un ensayo de desafío llevado a cabo en un laboratorio de análisis de alimentos competente para realizar este tipo de ensayos según el Documento de Orientación del EURL-*Lm*[13]. El ensayo de desafío presenta las siguientes características:

- **Número y características de los lotes:**

En el ensayo de desafío se emplearon tres lotes independientes (diferentes lotes de materias primas y días de producción) de ensaladilla rusa, que presentaban las siguientes propiedades físico-químicas:

	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Promedio	DE*	Promedio	DE*	Promedio	DE*
pH	5,67	0,04	5,56	0,06	5,43	0,05
a_w	0,994	0,002	0,993	0,003	0,990	0,002

* DE: desviación estándar

Los lotes fueron enviados al laboratorio de análisis al día siguiente a su fecha de producción, y el ensayo de desafío comenzó para cada lote, el día siguiente a la recepción del lote en el laboratorio.

De acuerdo con la guía técnica, *es preciso conocer las características fisicoquímicas del producto. El pH y a_w son fundamentales.*

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.

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.

Se dispone de un histórico de datos suficiente para caracterizar la variabilidad intralote (un mínimo de cinco valores por lote) e interlote (un mínimo de tres lotes diferentes) analizados en un periodo en el que se refleje la posible variabilidad (últimos 3 años de producción). El análisis de ese histórico de datos permite concluir que los lotes analizados durante el ensayo de desafío son representativos de la producción, ya que los tres lotes se encuentran, considerando tanto el pH como la a_w, dentro del rango del 90 % del histórico de datos. Uno de los lotes presenta además valores próximos al percentil 95, representando un escenario desfavorable en términos de posible crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

[13]EURL Lm GUIDANCE DOCUMENT EURL to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods Version 3 10/02/2023

El ensayo de desafío cumple los requisitos mínimos en cuanto al número y la elección de los lotes de análisis.

- **Cepas de *L. monocytogenes*:** se utilizó un cóctel de tres cepas distintas de *L. monocytogenes* (una de ellas es la cepa 12MOB047LM de la colección del laboratorio europeo de referencia para *L. monocytogenes*; las otras dos son cepas propias del laboratorio donde se ejecutó el ensayo de desafío y provenían de una muestra de queso y de una muestra ambiental de una industria alimentaria, respectivamente).

De acuerdo com la guía técnica, *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. 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 (μmáx. se ha determinado en pH extremos, a_w y temperatura (anexo 10.5 de la guía).*

La cepa 12MOB047LM, de acuerdo con el anexo 10.5 de la guía es una cepa del serotipo II recomendada para la categoría otros productos (distintos de productos cárnicos, productos de pescado y productos lácteos) con capacidad de crecimiento a a_w baja (0,95), pH bajo (5,0) y temperatura baja (8°C).

El ensayo de desafío cumple los requisitos mínimos en cuanto a la elección y número de cepas de *L. monocytogenes.*

- **Preparación del inóculo:** cada cepa de *L. monocytogenes* fue, en primer lugar, crecida en 9 mL de caldo BHI a 37°C durante 16 horas y, posteriormente, ese cultivo bacteriano fue utilizado para preparar un segundo cultivo en caldo BHI (inoculando 0,1 mL del primer subcultivo en 9 mL de caldo BHI), que fue incubado a 10°C durante 3 días. Posteriormente, los cultivos de las tres cepas de *L. monocytogenes* fueron mezclados en cantidades iguales, para obtener el cóctel a utilizar para la inoculación de los lotes de ensaladilla rusa. Finalmente, se realizaron varias diluciones del cóctel de cepas de *L. monocytogenes* en agua fisiológica para obtener el inóculo a la concentración deseada.

De acuerdo con la guía técnica, *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.*

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.

El medio de cultivo, las temperaturas y tiempos de incubación y el procedimiento general de precultivo, mezcla y dilución para la preparación del inóculo bacteriano cumple las recomendaciones de la guía.

- **Inoculación de la muestra:** Se realizó una inoculación en profundidad de 500 g de ensaladilla rusa para cada lote. Para ello, se sacó el alimento de su envase, y se inoculó con 0,5 mL del inóculo preparado como se ha indicado previamente. Posteriormente, se procedió a mezclar intensamente las muestras con el inóculo y se envasaron a vacío en envases con idénticas propiedades de barrera a las del envase original, en este caso de 500 g. De acuerdo a la guía técnica, l*a inoculación 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 en 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 microbiológica del producto.*

El volumen del inóculo que se introducirá en la matriz alimentaria no deberá exceder el 1 % de la (p/v) de la masa de producto, para no alterar significativamente las características físico-químicas del mismo; el volumen máximo del inóculo para la inoculación de 500 g es 5 mL. El laboratorio empleó un volumen inferior, de 0,5 mL.

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.

En este caso, se obtuvo una desviación estándar de 0,12 log ufc/g para el lote 1, 0,06 log ufc/g para el lote 2 y 0,08 log ufc/g para el lote 3, por lo que queda demostrada la distribución homogénea del inóculo en el alimento:

	Momento 0	t_0
	[Lm]	Media +/- DE
Lote 1	2,12	2,23 +/- 0,12
	2,35	
	2,21	
Lote 2	2,14	2,15 +/- 0,06
	2,1	
	2,22	
Lote 3	2,2	2,26 +/- 0,08
	2,22	
	2,35	

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 este caso, se empleó una técnica de inoculación fuera del envase en profundidad, al tratarse de un alimento preparado mezclando varios materiales, seguida de un envasado en condiciones análogas a las de distribución del producto, por lo que se siguen adecuadamente las recomendaciones de la guía.

En cuanto al nivel de contaminación, de acuerdo a la guía *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 este caso, el nivel medio de contaminación del producto fue de 2,21 log ufc/g (equivalente a 162 ufc/g), por lo que se encuentra en el rango recomendado.

- **Almacenamiento de muestras:** las muestras fueron almacenadas a 7°C durante 14 días, seguidos de 7 días a 9,5°C (la vida útil declarada del producto es 21 días).

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

De acuerdo con la guía técnica, *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 suela producirse) durante el ensayo de desafío, podría infravalorarse el crecimiento de la Lm y sobrestimarse la duración de la vida útil.*

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 de la guía, que es de 7°C para esta fase, con una duración de 1/3 de la vida útil. 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 de la guía, que es de 7°C para la fase 2 (para una duración de 1/3 de la vida útil) y de 10°C para la fase 3 (para una duración de 1/3 de la vida útil).

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.

En este caso, se utilizaron de forma apropiada las condiciones por defecto durante las dos primeras fases del almacenamiento:

- 7°C durante 7 días (1/3 de la vida útil) para la fase de fabricación.
- 7°C durante 7 días (1/3 de la vida útil) para la fase minorista.

Para la tercera fase se utilizó el dato correspondiente al percentil 95 de los datos de las temperaturas de las neveras domésticas en España[14].

- 9,5°C durante 7 días (1/3 de la vida útil) para la fase de consumidor.
- **Análisis de muestras:** se realizó una enumeración de *L. monocytogenes* al inicio del ensayo de desafío (t=0), al final de la vida útil declarada (t=21) y en tres puntos intermedios del ensayo (t=5; t=10; t=15). En cada punto de muestreo se enumeró *L. monocytogenes* en 3 unidades de ensayo. Se siguió para ello la norma EN ISO 11290-2. También se realizaron al inicio del ensayo de desafío (t=0) y al final de la vida útil declarada (t=21), determinaciones de características fisicoquímicas (pH y a_w) y recuentos de microbiota aerobia mesófila (EN ISO 4833) empleando 3 unidades de control en cada punto de muestreo. Además, se utilizó una unidad de control para el seguimiento continuo de la temperatura durante el ensayo de desafío, para asegurar la correcta ejecución del perfil

[14]Jofré A, Latorre-Moratalla ML, Garriga M y Bover-Cid S, 2019. Domestic refrigerator temperatures in Spain: assessment of its impact on the safety and shelf-life of cooked meat products. Food Research International,126, 108578. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108578

tiempo/temperatura seleccionado. Finalmente, se analizaron 3 muestras de control alimentario con la finalidad de verificar las condiciones microbiológicas (confirmar la no detección o los niveles de *Listeria monocytogenes* presentes antes de la inoculación y de microbiota acompañante) y fisicoquímicas iniciales del producto no inoculado.

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.

El procedimiento seguido por el laboratorio de análisis cumple lo establecido en la norma EN ISO 20976-1 y el anexo 10.8 (Tabla 12) de la guía técnica en lo que respecta al número de unidades que deben prepararse (número de unidades de ensayo que deben inocularse, número de unidades de control y muestras de control alimentario), y el número de puntos de muestreo, así como en los relativo a los métodos de análisis estandarizados empleados.

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 *L. monocytogenes*	**15**	3 unidades de ensayo por cada uno de los 5 puntos de muestreo
Muestras de control alimentario	Detección de *L. monocytogenes*	**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 relazar todos los análisis necesarios.

- **Cálculo del potencial de crecimiento:** para cada lote, el potencial de crecimiento Δ se calculó mediante la fórmula: $\Delta = \log_{máx.} - \log i$. Donde $\log_{máx.}$ es, en este caso, el recuento medio más alto obtenido en los 4 puntos de muestreo (excluyendo la muestra en t_0); y log i hace referencia al recuento medio de las 3 unidades de ensayo analizadas en el momento cero (t0). El potencial de crecimiento de todos los lotes analizados es el mayor valor de Δ obtenido. En la tabla inferior se muestran los recuentos obtenidos en cada punto de muestreo, y el potencial de crecimiento calculado, indicativo de una inactivación progresiva de *L. monocytogenes* durante el ensayo de desafío.

	Momento 0	t_0	Momento 1	t_5	Momento 2	t_{10}	Momento 3	t_{15}	Momento 4	t_{21}	Δ lote	Δ
	[Lm]	Media +/- DE	[Lm]	Media +/- DE	[Lm]	Media +/- DE	[Lm]	Media +/- DE	[Lm]	Media +/- DE		
Lote 1	2,12	2,23 +/- 0,12	2,12	2,0 +/- 0,12	1,85	1,72 +/- 0,11	1,45	1,44 +/- 0,08	1,12	1,11 +/- 0,08	2,0 - 2,23 = -0,23	0
	2,35		1,98		1,67		1,36		1,18			
	2,21		1,89		1,64		1,52		1,03			
Lote 2	2,14	2,15 +/- 0,06	1,67	1,81 +/- 0,15	1,45	1,46 +/- 0,09	1,08	1,16 +/- 0,09	<1	<1	1,81 - 2,15 = -0,34	
	2,1		1,79		1,38		1,14		<1			
	2,22		1,97		1,56		1,25		<1			
Lote 3	2,2	2,26 +/- 0,08	2,01	1,89 +/- 0,11	1,56	1,59 +/- 0,16	1,23	1,22 +/- 0,07	<1	<1	1,89 - 2,26 = -0,37	
	2,22		1,87		1,45		1,15		<1			
	2,35		1,79		1,76		1,29		<1			

El cálculo del potencial de crecimiento se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la guía técnica. De acuerdo con la guía técnica, si el potencial de crecimiento es inferior a 0,5 log se considera que *L. monocytogenes* no es capaz de crecer en el producto. En el caso de la ensaladilla rusa, el potencial de crecimiento fue 0, por lo que se asume que no puede favorecer el crecimiento de Lm (Categoría 1.3 del Reglamento (CE) N.º 2073/2005).

Respuestas al listado de verificación.

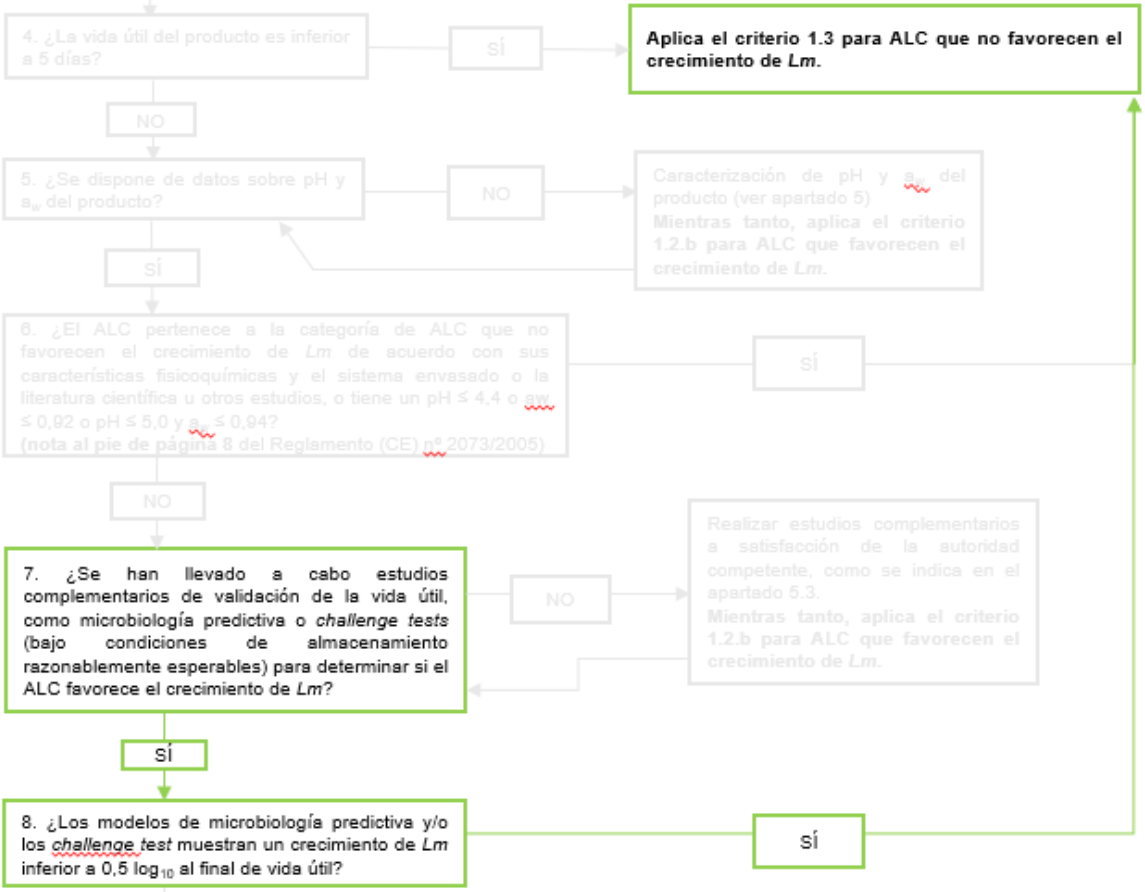
En relación con el listado de verificación estaríamos en la siguiente situación:

5.2. ENSAYOS DE DESAFÍO	**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
Se han realizado ensayos de desafío para valorar la capacidad de Lm para crecer en el alimento (potencial de crecimiento Δ). En caso de respuesta afirmativa, completar sección 5.2.1.	**X**		
Se han realizado ensayos de desafío para estimar los parámetros de crecimiento de Lm (tasa de crecimiento máximo, μmax). En caso de respuesta afirmativa, completar sección 5.2.2.		**X**	
El laboratorio que realiza el ensayo dispone de garantías adecuadas de competencia técnica (p. ej., acreditación EN ISO/IEC 17025, controles de calidad, participación satisfactoria en ensayos de aptitud)	**X**		
El informe indica expresamente que el ensayo se ha diseñado y ejecutado conforme a la guía técnica del EURL-Lm sobre ensayos de desafío.	**X**		
Se describe de forma completa el producto (características fisicoquímicas, denominación, composición, sistema de envasado, peso/formato, tipo de producto, vida útil prevista, modo de conservación, instrucciones de uso, fecha de fabricación, etc.)	**X**		
Se ha evaluado la variabilidad intralote (mínimo 5 valores) e interlote (mínimo de 3 lotes diferentes) de aquellos factores relevantes del producto (p.ej. pH y aw).	**X**		
Se describen las condiciones del proceso que puedan influir en el crecimiento de Lm (p. ej., tratamiento térmico, ahumado, secado, maduración, troceado, picado, salado, congelación, etc.)	**X**		
Se aporta información que demuestra que los lotes objeto de ensayo son representativos de la producción (al menos 3 lotes) Si se utiliza un solo lote ¿está justificado correctamente?	**X**		
Se justifica que el producto/lote objeto de ensayo representa el escenario más desfavorable en términos de posible crecimiento de Lm.	**X**		
5.2.1. ENSAYOS DE DESAFÍO PARA EVALUAR EL POTENCIAL DE CRECIMIENTO (Δ)	**SÍ**	**NO**	

Para evitar cambios físico-químicos en el producto, ¿Se ha realizado la inoculación dentro de los 2 días posteriores a su fabricación?		**X**		
En caso de haber transcurrido más de 2 días desde la fabricación hasta la inoculación, ¿se justifica conforme a la guía técnica del EURL-Lm?				**X**
Se describe y justifica la elección de las cepas inoculadas (caracterizadas por origen y características de crecimiento)		**X**		
¿Los lotes se han inoculado con la misma mezcla de cepas?		**X**		
Se describe	la preparación del inóculo (subcultivos, condiciones, volumen total, etc.);	**X**		
	la concentración objetivo, siendo esta próxima a 100 ufc/g o ml (entre 50-200 ufc/g o ml) o, si se usa otra concentración, ¿se justifica técnicamente?	**X**		
La técnica de inoculación es adecuada al tipo de producto y al escenario realista de contaminación "natural" y se comprueba que no altera de forma relevante las propiedades del alimento. *Ej.: inoculación en "superficie" para reproducir contaminación cruzada desde superficie de cortadora; inoculación en "profundidad" para reproducir contaminación en productos sometidos a picado/amasado, etc.*		**X**		
¿El ensayo incluye también muestras de control (sin inocular) para ver la ocurrencia natural de *L. monocytogenes* en el producto?		**X**		
Se demuestra que la distribución del inóculo es homogénea en tiempo 0, de forma que la desviación estándar de las 3 unidades inoculadas es < 0,3 log ufc/g.		**X**		
Se ha inoculado y realizado recuento de Lm en al menos 7 muestras por lote, 3* en tiempo 0 (tras inocular), 3 a lo largo de la vida útil y 1 al final? **Puede ser 1 si los 3 lotes se inoculan de manera simultánea.*		**X**		
Se ha realizado investigación de *Lm* en la muestra control obteniendo un resultado de no detección en 25 g (*si se detecta se puede seguir el ensayo siempre que el recuento sea inferior al obtenido en las muestras inoculadas*)		**X**		
Se han contemplado las condiciones	Envasado (al vacío, atmósferas modificadas, etc.)	**X**		
	Temperaturas de almacenamiento en la industria (7ºC)	**X**		

razonablemente previsibles de:	Temperaturas de almacenamiento en el comercio al por menor (7ºC)	**X**		
	Temperaturas de almacenamiento por el consumidor (10ºC)		**X**	
En caso contrario, ¿se han conservado reproduciendo las condiciones razonablemente previsibles aportadas por el operador, justificadas por información detallada, estableciendo las mismas en el percentil 95 de sus observaciones?		**X**		
¿Se han medido en las unidades de control los parámetros fisicoquímicos fundamentales del producto (al menos pH y aw) y se ha realizado control de temperatura y recuento de microbiota asociada?		**X**		
Los análisis de detección y recuento de Lm se han realizado utilizando los métodos de referencia (EN ISO 11290-1 y EN ISO 11290-2) o con métodos alternativos conforme al artículo 5 del Reglamento (CE) nº 2073/2005.		**X**		
Se incluyen los cálculos realizados para valorar el potencial de crecimiento y se interpretan correctamente: - **Δ > 0,5 log10** implica que el alimento **favorece el crecimiento de *Lm*** - **Δ ≤ 0,5 log10** implica que **no favorece el crecimiento de *Lm***		**X**		
Conclusión:	**¿El ensayo de desafío aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no favorece el crecimiento de *Lm***? En caso negativo, indicar motivos en observaciones.	**X**		
	Si el producto favorece el crecimiento de Lm, ¿el ensayo de desafío proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil? En caso negativo, indicar motivos en observaciones			**X**
Observaciones:				

Respuesta al árbol de decisiones.



Conclusión

Se concluye que la empresa ha proporcionado evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria de *L. monocytogenes* que le es de aplicación (1.3), y el resultado de la verificación del estudio es SUFICIENTE.

Es responsabilidad del operador verificar que los lotes producidos a partir de la verificación suficiente del estudio siguen cumpliendo el criterio para mantenerse en la categoría 1.3.

EJEMPLO 8 - JUSTIFICACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN DE UN JAMÓN COCIDO LONCHEADO ENVASADO AL VACÍO EN LA CATEGORÍA 1.3 MEDIANTE UN ENFOQUE DE SEGURIDAD POR DISEÑO, MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA Y ENSAYO DE DESAFÍO.

Planteamiento

Un operador elabora y comercializa jamón cocido loncheado envasado al vacío en unidades de 150 g. La formulación inicial del producto incluye únicamente nitrito sódico como único aditivo con acción conservante. El operador desea establecer una vida útil refrigerada de 45 días y estudia la reformulación del producto mediante la incorporación de aditivos con efecto antimicrobiano[1].

Formulación base del producto

La formulación base del jamón cocido corresponde a un producto convencional, elaborado mediante inyección de salmuera sobre magro de cerdo, cocción, loncheado y envasado al vacío en sala blanca. La composición cuantitativa se detalla en la tabla siguiente:

Ingrediente	Cantidad (% p/p)
Jamón de cerdo (deshuesado, sin grasa subcutánea)	91,0
Agua (salmuera)	5,43
Sal común (NaCl)	2,10
Dextrosa	0,70
Tripolifosfato sódico (E 451)	0,50
Carragenato (E 407)	0,20
Ascorbato sódico (E 301)	0,06
Nitrito sódico (E 250)	0,012



Figura 1. Imagen del jamón cocido objeto del ejemplo generada con IA.

El producto se lonchea y envasa al vacío en film PET/PE de baja permeabilidad al oxígeno en unidades de 150 g. Se comercializa refrigerado con instrucción de conservación a temperatura ≤ 5 °C.

El operador quiere valorar la posibilidad de reformular con antimicrobianos para conseguir inhibir completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil del producto conservado en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización. El propósito es justificar que el producto no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes* y que, por tanto, puede clasificarse en la categoría 1.3. Esta conclusión contribuiría asimismo a justificar el uso de una fecha de consumo preferente, siempre que se demuestre que ningún otro peligro microbiológico limita la seguridad del producto y que su durabilidad organoléptica es compatible con la vida útil propuesta.

[1] Ejemplo basado en el trabajo Bover-Cid, S., Serra-Castelló, C., Dalgaard, P., Garriga, M., Jofré, A. (2019). New insights on *Listeria monocytogenes* growth in pressurised cooked ham: A piezo-stimulation effect enhanced by organic acids during storage. International Journal of Food Microbiology, 290: 150-158

Para justificar la clasificación del producto en la categoría 1.3, el operador desarrolla tres etapas sucesivas de trabajo:

PARTE 1. Caracterización fisicoquímica de la formulación inicial. Se determina que el producto puede favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* y se decide reformularlo.

PARTE 2. Diseño de formulaciones alternativas mediante microbiología predictiva (FSSP v4.0), incorporando lactato potásico (E-326), solo o combinado con diacetato sódico (E-262).

PARTE 3. Validación experimental mediante un *challenge test*. Se determina el potencial de crecimiento (Δ) de *L. monocytogenes* bajo un perfil de temperatura razonablemente previsible.

PARTE 1. Caracterización del producto de base

El operador presenta los resultados de pH, a_w, concentración de sal y humedad obtenidos en 3 lotes de producción de la formulación inicial (sin lactato ni diacetato), con 5 muestras por lote (n = 15, Tabla 1), conforme al mínimo exigido para la caracterización fisicoquímica (apartado A.2 del listado de verificación).

Adicionalmente, se aportan datos de caracterización microbiológica relativos a los recuentos de bacterias acidolácticas, consideradas el grupo microbiano más relevante en productos cárnicos cocidos envasados al vacío por su posible influencia en el comportamiento de *L. monocytogenes*. En las 15 muestras analizadas, los recuentos de bacterias acidolácticas se mantuvieron por debajo del límite de detección (< 100 ufc/g).

Tabla 1. Resultados de la caracterización fisicoquímica del jamón cocido.

Lote	Muestra	pH	a_w	Sal (%NaCl)	Humedad (%agua)	WPS (%)*
Lote 1	1	6,15	0,976	3,38	72,7	4,44
	2	6,11	0,975	3,13	73,4	4,09
	3	5,90	0,981	2,91	74,6	3,75
	4	6,10	0,974	3,45	74,6	4,42
	5	6,14	0,976	3,04	71,9	4,06
Lote 2	1	5,95	0,975	3,26	73,9	4,22
	2	6,09	0,977	2,98	73,3	3,91
	3	6,07	0,973	3,63	73,3	4,72
	4	6,12	0,975	3,24	71,6	4,33
	5	6,10	0,979	2,95	73,7	3,85
Lote 3	1	6,13	0,977	2,91	74,0	3,78
	2	6,08	0,975	3,40	75,4	4,31
	3	6,10	0,976	3,13	73,5	4,08
	4	6,00	0,982	2,84	75,8	3,61
	5	6,11	0,974	3,17	71,7	4,23

*Sal en fase acuosa, calculada a partir de la ecuación: WPS(%) = (%NaCl*100)/(%agua + %NaCl)

Los valores de pH y a_w se sitúan muy por encima de los límites de crecimiento de *L. monocytogenes*, tal como se refleja en la representación gráfica disponible en la herramienta BestDate (http://bestdate.irta.cat) (Figura 2).

Mediante la herramienta BestDate, que incorpora el árbol de decisiones desarrollado por EFSA[1] para determinar el tipo de fecha más adecuado para los alimentos envasados, se concluye que este producto:

- ha sido sometido a un tratamiento de pasteurización durante la etapa de cocción, capaz de eliminar los patógenos vegetativos presentes[2] (P4)
- se ha expuesto a recontaminación durante las operaciones de loncheado y envasado (P5)
- no recibe ningún tratamiento postletal tras el envasado final (P6)
- presenta unas características fisicoquímicas (pH y a_w) que, por sí solas, no impiden el crecimiento de patógenos vegetativos (P8).
- no se dispone de evidencias que demuestren que el alimento no permite el crecimiento de patógenos ni la producción de toxinas en condiciones razonablemente previsibles de conservación.

En consecuencia, y de acuerdo con el árbol de decisiones de EFSA, el jamón cocido loncheado envasado al vacío, en su formulación básica, debe etiquetarse con una "fecha de caducidad", ya que no existen elementos que permitan descartar la posibilidad de crecimiento de microorganismos patógenos (e.g. *L. monocytogenes*) durante su vida útil.

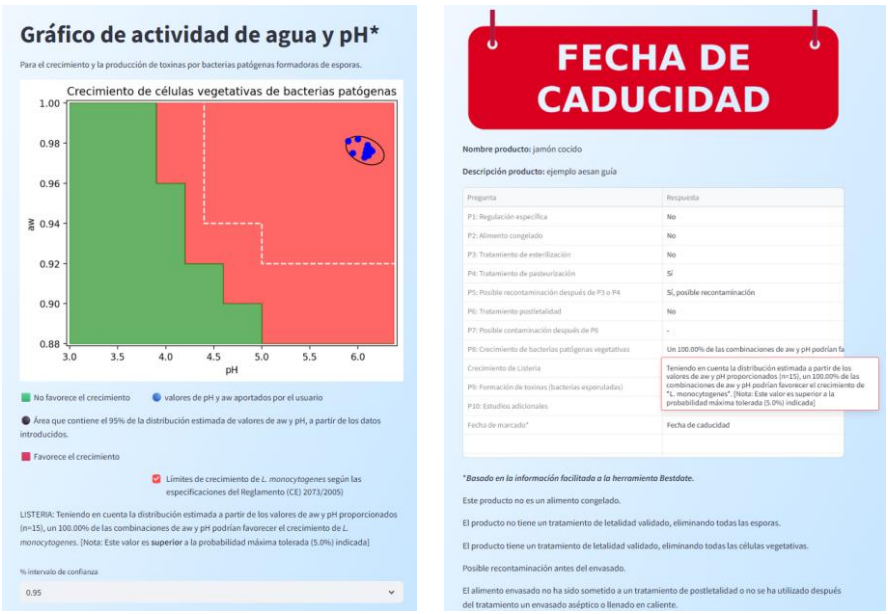


Figura 2. Captura de pantalla de la aplicación BestDate (http://bestdate.irta.cat) en la que se han introducido los 15 pares de valores de pH y a_w obtenidos a partir de 3 lotes de jamón cocido.

[1] EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, Nauta M, eixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Jacxsens L., Skjerdal T, Da Silva Felicio MT, Hempen M, Messens W and Lindqvist R, 2020. Guidance on date marking and related food information: part 1 (date marking). EFSA Journal 2020;18(12):6306, 74 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6306

[2] Se asume que el operador ha validado el tratamiento de cocción

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA DEL PRODUCTO.		SÍ	NO	NO APLICA
La caracterización del producto incluye:	pH	x		
	a_w	x		
	Concentración de aditivos			x
	Estructura (sólido, líquido)	x		
	Microbiota habitual	x		
	Compuestos fenólicos			x
	Otros			x
¿Se dispone de un mínimo de 15 datos de pH y /o de a_w correspondientes a tres lotes diferentes (n= 5/ lote) representativos de la producción?		x		
Se caracteriza la variabilidad intra e inter-lote de pH y / o a_w, y se estima que la probabilidad de que el pH y/o la a_w sean superiores al límite establecido en la nota 8 es inferior al 5% (es decir, existe una confianza estadística superior al 95% de que el pH y/o la a_w es inferior al límite establecido). - **pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92** - **pH ≤ 5,0 y a_w ≤ 0,94**			x	
Para los alimentos multicomponente (por ejemplo, un sándwich) estos valores se han calculado para cada uno de los componentes separados del producto una vez montado, esperando el tiempo suficiente, que se habrá registrado, para que haya podido darse la interacción entre los ingredientes. Se ha considerado el componente más favorable para el crecimiento microbiano. No se deben calcular a partir de una muestra homogeneizada del producto completo.				x
Se caracterizan otros factores intrínsecos o extrínsecos empleados para justificar la vida útil establecida (p.ej., concentración de aditivos).				x
La vida útil establecida es inferior a 5 días			x	
Conclusión: El alimento está correctamente caracterizado.		x		
Observaciones:				
Conclusión: El operador puede justificar que pertenece a la categoría 1.3 de productos que no pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes* por pH/a_w (nota 8 Reglamento (CE) 2073/2005).			x	
Observaciones:				

Resolución del ejemplo Parte 1

El jamón cocido loncheado envasado al vacío, formulación básica, no cumple ninguno de los criterios automáticos de la nota 8. Se trata de un alimento que puede favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y, por tanto, en su formulación básica quedaría clasificado en la categoría 1.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005.

PARTE 2. Diseño de una nueva formulación mediante microbiología predictiva, incorporando lactato potásico (E-326) y/o diacetato sódico (E-262).

2.1. Selección y justificación del uso del modelo

El operador, a través de la colaboración de un grupo de investigación con experiencia y capacidad contrastada en el desarrollo, validación y aplicación de herramientas de la microbiología predictiva, utiliza el modelo "Growth of *Listeria monocytogenes* in chilled seafood and meat products" (Mejlholm y Dalgaard, 2009) validado para productos cárnicos cocidos (Mejlholm et al., 2010) e implementado en el software Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP v4.0), disponible libremente en http://fssp.food.dtu.dk. La justificación de su idoneidad para el producto en cuestión se resume en la Tabla 2, junto con las referencias bibliográficas correspondientes.

El factor de sesgo B_f=1 indica que, en promedio, el modelo no sobreestima ni subestima las velocidades de crecimiento de *L. monocytogenes*. El factor exactitud (A_f) representa el promedio de la diferencia entre las velocidades observadas y predichas. De acuerdo con la literatura científica, un factor de exactitud inferior a 1,5 indican una precisión aceptable del modelo (Ross et al. 2000).

Tabla 2. Justificación de la idoneidad del modelo predictivo utilizado

Elemento de validación	Descripción	Justificación
Rango de aplicabilidad del modelo	Temperatura: 2-25 °C · pH 5,6-7,7 Sal en fase acuosa: 0,7-9,0% Nitrito: 0-150 ppm Ácido láctico: 0-60.000 ppm en fase acuosa Diacetato: 0-3.800 ppm en fase acuosa	Todos los parámetros del jamón cocido loncheado están dentro del dominio del modelo.
Validación específica en productos cárnicos cocidos	Concretamente, para productos cárnicos cocidos, se contrastó la velocidad de crecimiento observada en 702 *challenge test* con las predicciones proporcionadas por el modelo (Mejlholm et al., 2010).	Índices de funcionamiento predictivo para productos cárnicos cocidos: factor sesgo B_f = 1,0; factor de exactitud A_f = 1,4; predicciones correctas del límite de crecimiento 86,2% (6,4% *fail-safe*, 7,4% *fail-dangerous*).
Referencias bibliográficas	FSSP v4.0. Food Spoilage and Safety Predictor. National Food Institute, Technical University of Denmark. http://fssp.food.dtu.dk (información sobre el modelo de crecimiento de *L. monocytogenes*: http://fssp.food.dtu.dk/Help/Listeria/Lm/lm.htm). Mejlholm, O., Dalgaard, P. (2009). Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for *Listeria monocytogenes* in lightly preserved and ready-to-eat shrimp. Journal of Food Protection, 72: 2132-2143. Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., Dalgaard, P. (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. International Journal of Food Microbiology, 141: 137-150. Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. International Journal of Food Microbiology 62, 231-245	

2.2. Selección y justificación de los valores de entrada al modelo

Se aplica un enfoque conservador seleccionando, entre los datos de la caracterización de producto (Parte 1), los valores más favorables para el crecimiento de *L. monocytogenes*. Concretamente:

- pH = 6,15 (valor más alto observado)
- Sal en fase acuosa = 3,61% (valor más bajo calculado a partir de las determinaciones analíticas de sal y contenido acuoso)
- Concentración de ácido láctico/lactato endógeno: se asume un valor de 0,7% como concentración razonable[1], y se utiliza el valor más elevado de contenido acuoso (75,8%) para calcular la concentración de ácido láctico en fase acuosa (9150 mg/l de acuerdo con la calculadora disponible en el programa FSSP, ver captura de pantalla en la Figura 3).

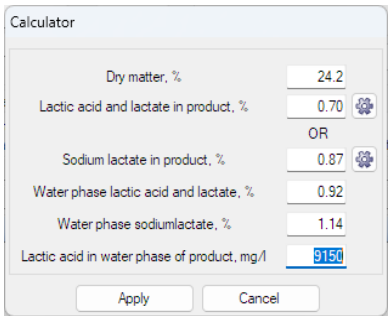


Figura 3. Calculadora FSSP para determinar la concentración de ácido láctico expresado en fase

- Temperatura: se evalúa 7 °C y 10 °C, como temperaturas razonablemente previsibles durante la cadena de suministro y conservación del producto, incluida la conservación por parte del consumidor (EURL-Lm, 2026).

La combinación utilizada constituye un escenario conservador construido a partir de los valores individuales más favorables para el crecimiento observados en el conjunto de datos, aunque estos no correspondan necesariamente a una misma unidad de producto.

2.3. Simulación de formulaciones alternativas

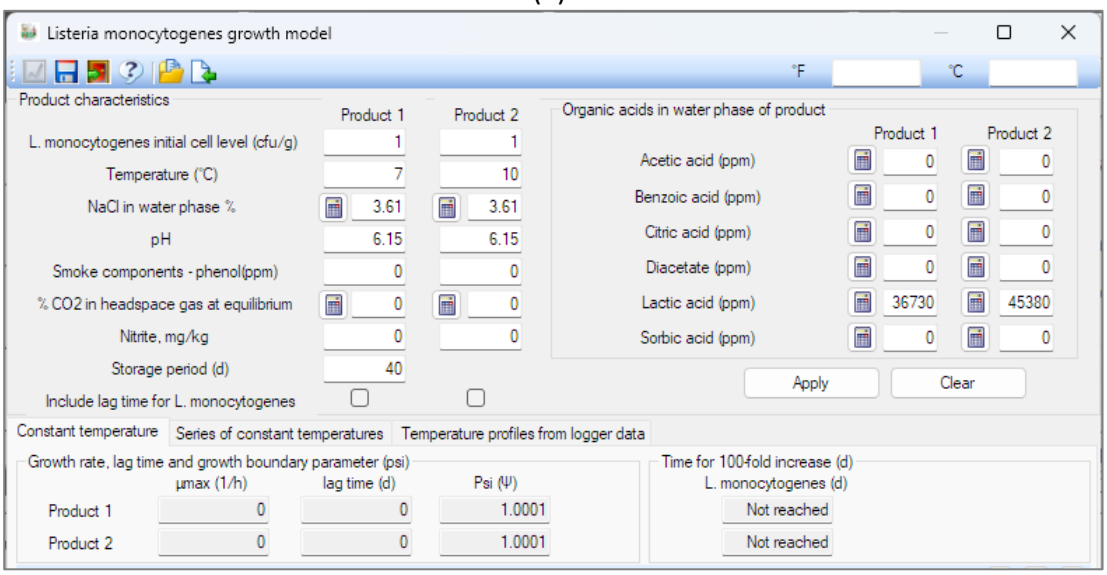
Se simulan dos estrategias de formulación a través de la adición de aditivos conservantes para conseguir la inhibición total del crecimiento de *L. monocytogenes*:

(a) Adición de la cantidad suficiente de lactato potásico (E-326);
(b) Adición de 2% de lactato potásico (E-326) en combinación con una cantidad suficiente de diacetato (E-262).

Por ello, se establece el objetivo de conseguir que el parámetro ψ (psi, parámetro de límite de crecimiento o *growth boundary parameter*) sea igual o superior a 1 (Figura 4), lo que implica que la velocidad específica de crecimiento sea cero (μ_{max} = 0). El valor de ψ = 1 significa que la combinación de factores se sitúa en el límite de crecimiento, por lo que a menudo se recomienda fijar objetivos de ψ >1. Sin embargo, en este caso no se ha tenido en consideración la presencia de nitrificantes en la formulación ni el efecto humectante (reductor de la a_w) cuando se añade lactato en la formulación.

[1] Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., Dalgaard, P. (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. International Journal of Food Microbiology, 141: 137-150

(a)



(b)

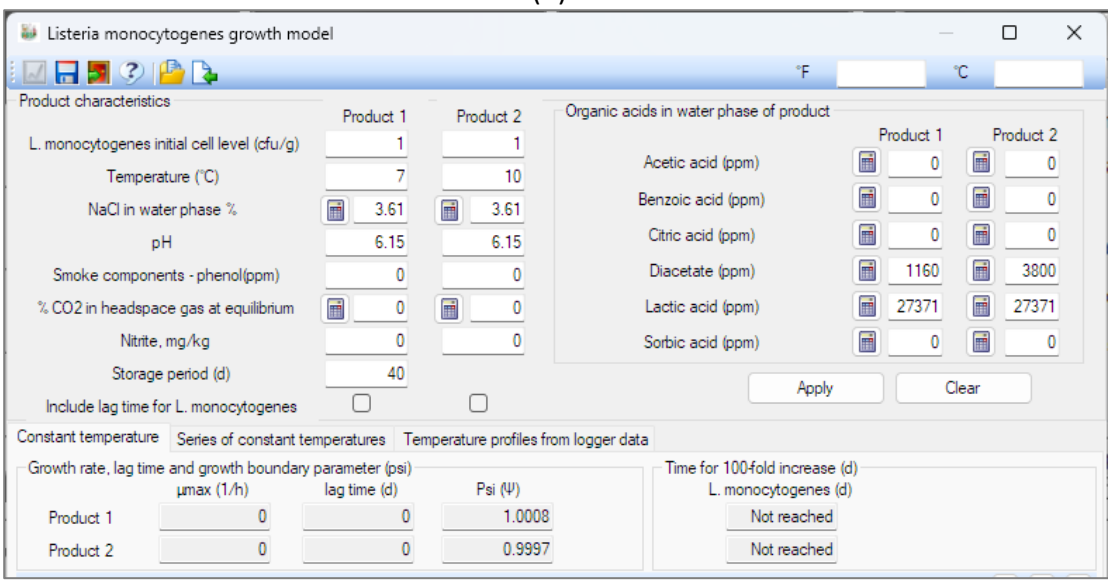


Figura 4. Captura de pantalla del programa FSSP en la que se predice la concentración de (a): ácido láctico/lactato (ppm en fase acuosa) y (b): ácido láctico/lactato y diacetato (ppm en fase acuosa) para conseguir ψ =1

5. ALC QUE PUEDEN FAVORECER EL CRECIMIENTO DE *L.m.* ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS			
5.1. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
El informe está avalado por expertos y, en caso de haberse hecho por terceros, esto se indica específicamente.	**x**		
El informe describe claramente el objetivo del estudio	**x**		

El informe parte de una caracterización adecuada del alimento (ver listado de verificación 1)		**x**		
Se indica la estrategia de búsqueda, criterios de selección y fuente de los modelos seleccionados (FSSP, Pathogen Modelling Programme, MicroHibro…).		**x**		
Se describe el modelo seleccionado		**x**		
Se comprueba que el producto está dentro del rango de aplicación del modelo.		**x**		
Se describen las condiciones de la simulación	Se justifican los parámetros introducidos (pH, $a_{w,}$ conservantes, etc.) (ver apartado 5.3.1 Selección del peor escenario posible)	**x**		
	Se justifica la concentración inicial de Lm introducida en el modelo (de manera general, un escenario conservador es partir de una concentración inicial de 1 ufc/g)			**x**
	Se definen temperaturas de simulación, que cubren las condiciones razonablemente previsibles de conservación del producto objeto de estudio (tabla 4 del documento de orientación).	**x**		
	Se considera que la fase de latencia es cero (escenario conservador)	**x**		
El modelo ha sido validado con experimentos / datos independientes usando cepas, productos y condiciones de conservación diferentes a las que se utilizaron en su elaboración (dentro del rango de aplicabilidad).		**x**		
Se considera la variabilidad asociada a las diferencias de procesado, de las características del alimento y de las condiciones de almacenamiento.		**x**		
Presentación de resultados	Se presentan probabilidades de crecimiento.			**x** (ver observaciones)
	Se presentan curvas de crecimiento			**x**
	Se calcula el potencial de crecimiento			**x**
	Se presentan gráficas comparativas por producto, en caso de incluirse varios productos en el estudio			**x**
	Se clasifica el producto en función de si favorece o no el crecimiento de Lm			
Presentación de las conclusiones del informe	Indica las suposiciones y/o datos de partida sobre las que se basan las conclusiones	**x**		
	Indica los resultados de la simulación y cualquier otro dato,	**x**		

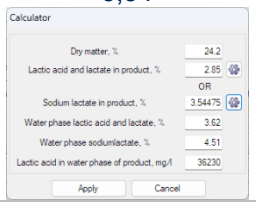
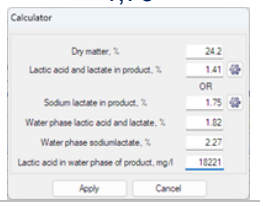
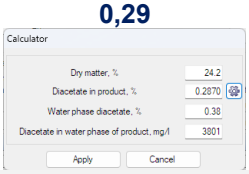
	incluido bibliográfico, empleados en la sustentación de las conclusiones			
	La vida útil propuesta está justificada por los resultados.			**X** (ver observaciones)
Conclusión:	**¿El estudio de microbiología predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran,** con **probabilidad de crecimiento menor del 10%, que el producto no favorece el crecimiento de *Lm***? En caso negativo, indicar motivos en observaciones	**X** (ver observaciones)		
	¿El estudio de microbiología predictiva aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil? En caso negativo, indicar motivos en observaciones			**x**
Observaciones:	*Se utiliza el modelo para estimar la concentración de conservantes para conseguir que el parámetro psi (ψ) = 1, que representa el límite de crecimiento. Se estima mediante el modelo que el alimento no favorece el crecimiento, por lo que la vida útil dependerá de elementos no relacionados con Listeria monocytogenes.*			

Resolución del ejemplo Parte 2

De acuerdo con las predicciones del modelo predictivo utilizado, validado para estimar los límites de crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos, considerando valores de entrada conservadores extraídos de la caracterización analítica del producto, la incorporación de 4% de lactato potásico o la incorporación de 2% de lactato potásico en combinación con 0,3% de diacetato sódico, permitiría inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en el jamón cocido conservado hasta 10 °C, con un valor de Ψ (psi) = 1, justo en el límite de crecimiento. Para definir características del producto destinadas a prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes* en los productos alimenticios, se recomienda utilizar un valor ψ de 2,0[1]. Por ello, se decide realizar un *challenge test* para validar el efecto listeriostático de las formulaciones diseñadas.

[1] http://fssp.food.dtu.dk/Help/Listeria/Lm/lm.htm

Tabla 3. Resultados de la simulación con FSSP para las condiciones de base (sin ácidos orgánicos añadidos) y los escenarios a (con lactato) y b (lactato y diacetato).

	Base	Escenario (a)	Escenario (b)
Valores de entrada			
Temperatura (°C)(1)	10	10	10
pH	6,1	6,1	6,1
Sal en fase acuosa (%)	3,61	3,61	3,61
Ácido láctico en fase acuosa (mg/l), del cual	9150	45380	27371
endógeno	9150	9150	9150
añadido	-	36230	18221
Concentración de lactato sódico añadido en producto (%)(2)		3,54 	1,75 
Concentración de lactato potásico añadido en producto (%)(3)	-	**4,05**	**2,00**
Diacetato añadido en fase acuosa (mg/l)	-	-	3800
Concentración de diacetato en el producto (%)(3)			**0,29** 
Predicciones			
μ_{max} (h^{-1})	0,0139	0	0
Ψ (psi)	0,5301	1,00	1,00
Tiempo en incrementar 2 log (días)	13,77	n.a.(4)	n.a.

(1): se muestra la simulación realizada a 10 °C, como la temperatura razonablemente previsible más elevada (fase del consumidor).
(2): según calculadora disponible en FSSP, se incluye captura de pantalla
(3): equivalencia teniendo en cuenta el peso molecular del lactato de Na (112,06 g/mol) y lactato de K (128,17 g/mol).
(4): no aplicable

PARTE 3. *Challenge test* de potencial de crecimiento (Δ).

3.1. Diseño experimental y criterio de evaluación

Para validar la eficacia de las formulaciones del jamón cocido diseñadas para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil de 45 días se llevó a cabo un ensayo de inoculación controlada (*challenge test*) de potencial de crecimiento conforme a las indicaciones de la Guía Técnica del EURL Lm (2026)[1] y la norma ISO 20976-1: 2019[2] (Tabla 4). El ensayo lo llevó a cabo un laboratorio que aporta las

[1] Versión traducida por AESAN: https://zenodo.org/records/19404200/files/20260226-EURL_Lm_TGD_Shelf-life_studies_v4.1-ES.pdf?download=1
[2] Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate. https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:20976:-1:ed-1:v1:en

garantías adecuadas de competencia técnica utilizando un producto elaborado en planta piloto semiindustrial 24h antes del ensayo.

Tabla 4. Elementos destacados del diseño experimental del *challenge test* conforme a las recomendaciones la Guía Técnica del EURL Lm (2026).

Parámetro	Condición
Producto ensayado	Jamón cocido loncheado envasado al vacío en unidades de 150 g: Formulación A: 4% de K-lactato Formulación B: 2% de K-lactato y 0,3% Na-diacetato
Objetivo del ensayo	Aportar evidencias sobre la eficacia listeriostática de la formulación durante 45 días de conservación desde la fecha de envasado, considerando temperaturas razonablemente previsibles.
Nº lotes independientes	3 lotes, elaborados en fechas distintas y a partir de materias primas de partidas diferentes
Tiempos de muestreo	5 tiempos: inicio (tiempo 0, t_0) y 4 puntos adicionales: 15, 26, 35 y 45 días (fin de la vida útil deseada)
Réplicas por punto de muestreo	3 unidades a tiempo cero (control de la inoculación) por lote y 1 unidad por punto de muestreo (n = 9 por punto para las medias)
Cóctel de cepas	3 cepas de *L. monocytogenes* mezcladas a partes iguales: cepa de referencia 12MOB045Lm (genoserotipo IIa, CC9), cepa clínica Scott A (serotipo 4b, CC2) y un aislado de producto cárnico CTC1034 (serotipo 4b, CC1)[1].
Nivel de inoculación	≈ 100 ufc/g (2 log ufc/g), inoculación superficial sobre lonchas.
Envasado	Al vacío en film PET/PE (idéntico al comercial)
Perfil de temperatura	Perfil razonablemente previsible: · Fase 1 — Fabricación y logística: días 0 – 7 (7 días) a 7 °C · Fase 2 — Distribución y retail: días 7 – 26 (19 días) a 7 °C · Fase 3 — Almacenamiento doméstico: días 26 – 45 (19 días) a 9,5 °C (P95 de temperaturas domésticas españolas según Jofré et al., 2019)[2]
Determinaciones microbiológicas	*L. monocytogenes* según ISO 11290-2: 2018 Bacterias acido-lácticas según ISO 15214:1998
Caracterización fisicoquímica analítica	pH, a_w, sal, contenido acuoso por lote al inicio y al final del estudio

El potencial de crecimiento (Δ) se calcula como: $\Delta = log_{max} - log_i$
donde log_{max} es el valor más alto del recuento de *L. monocytogenes* (log_{10} ufc/g) observada en cualquiera de los puntos de muestreo posteriores a t_0 y log_i es la media de los recuentos obtenidos en las tres unidades analizadas en t0. La desviación estándar de los recuentos en t_0 debe ser inferior a 0,3 log_{10} ufc/g. El potencial de crecimiento conservado entre todos los lotes ensayados es el valor Δ más alto obtenido entre los 3 lotes ensayados.
Interpretación:

Δ ≤ 0,5 log_{10}, el producto no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes*, formulación listeriostática;

Δ > 0,5 log_{10}, el producto favorece el crecimiento de *L. monocytogenes*.

[1] Austrich-Comas, A., Serra-Castelló, C., Jofré, A., Gou, P., & Bover-Cid, S. (2022). Control of *Listeria monocytogenes* in chicken dry-fermented sausages with bioprotective starter culture and high-pressure processing. Frontiers in microbiology, 13, 983265.

[2] Jofré, A., Latorre-Moratalla, M. L., Garriga, M., & Bover-Cid, S. (2019). Domestic refrigerator temperatures in Spain: Assessment of its impact on the safety and shelf-life of cooked meat products. Food research international, 126, 108578.

3.2. Resultados del *challenge test*

Los recuentos de *L. monocytogenes* y el correspondiente potencial de crecimiento calculado por lote y el global por estrategia de formulación se presentan en la Tabla 5 (estrategia basada en la adición de lactato potásico) y Tabla 6 (estrategia basada en la adición de lactato potásico y diacetato sódico).

El nivel de inóculo osciló entre 74-155 ufc/g en el jamón "Formulación A" y entre 100 y 135 ufc/g en la "Formulación B", en todos los casos la desviación estándar de la concentración logarítmica fue inferior a 0,3 Log_{10} ufc/g. Estos resultados confirman que el nivel y la homogeneidad del inóculo inicial cumplieron con las recomendaciones de la Guía técnica del EURL-Lm (2026).

Tabla 5. Recuentos y potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón cocido formulado con 4% de lactato potásico (Formulación A).

	Recuentos de *L. monocytogenes* (log_{10} ufc/g)						**Potencial de crecimiento (log_{10})**	
	Tiempo 0		**Día 15**	**Día 26**	**Día 35**	**Día 45**	**Δ** lote	**Δ** alimento
	Por réplica	Media ± DE*						
Lote 1	1,87 1,98 2,00	1,95 ± 0,07	2,05	**2,25**	2,15	2,20	2,25 − 1,95 = 0,30	
Lote 2	1,92 2,08 2,15	2,05 ± 0,12	**2,38**	2,28	2,15	2,32	2,38 − 2,05 = 0,33	**0,45**
Lote 3	2,10 2,16 2,19	2,15 ± 0,05	2,28	2,45	**2,60**	2,55	2,60 − 2,15 = **0,45**	

**DE: desviación estándar*

Tabla 6. Recuentos y potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón cocido formulado con 2% de lactato potásico y 0,3% de diacetato sódico (Formulación B).

	Recuentos de *L. monocytogenes* (log_{10} ufc/g)						**Potencial de crecimiento (log_{10})**	
	Tiempo 0		**Día 15**	**Día 26**	**Día 35**	**Día 45**	**Δ** lote	**Δ** alimento
	Por réplica	Media ± DE*						
Lote 1	2,05 2,10 2,03	2,06 ± 0,04	**2,36**	2,28	2,22	2,15	2,36 − 2,06 = **0,30**	
Lote 2	2,10 2,13 2,08	2,10 ± 0,03	2,24	2,28	**2,30**	2,25	2,30 − 2,10 = 0,20	**0,30**
Lote 3	2,03 2,00 2,05	2,03 ± 0,03	2,18	**2,22**	2,19	2,15	2,22 − 2,03 = 0,19	

**DE: desviación estándar*

El potencial de crecimiento es inferior a 0,5 log_{10} en ambos casos, por lo tanto, los resultados del *challenge test* confirman empíricamente que el jamón cocido elaborado con ambas formulaciones no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes* a temperaturas razonablemente previsibles de conservación (entre 7 y 9,5 °C).
La caracterización fisicoquímica (Tabla 7) refleja el efecto humectante del lactato, que contribuye a reducir ligeramente la a_w del producto respecto a la formulación base sin lactato. Por otra parte, la formulación que incorpora diacetato presenta un pH ligeramente inferior al del producto original sin los conservantes.

Tabla 7. Resultados de las determinaciones de pH, a_w y recuentos de bacterias ácido-lácticas (BAL, log_{10} ufc/g) al inicio (t_0) y al final del *challenge test* del jamón cocido con la formulación A y B.

Formulación	Lote	Muestra	t0			45 días		
			pH	a_w	BAL	pH	a_w	BAL
(A) 4% lactato potásico	Lote 1	1	6,11	0,961	nd	6,05	0,960	5,12
		2	6,16	0,963	nd	6,08	0,962	4,89
		3	6,17	0,963	nd	6,10	0,964	5,24
	Lote 2	1	6,11	0,973	nd	6,03	0,972	4,85
		2	6,10	0,971	nd	6,05	0,970	5,53
		3	6,11	0,971	nd	6,08	0,972	5,18
	Lote 3	1	6,18	0,970	nd	6,12	0,969	4,78
		2	6,13	0,968	nd	6,08	0,968	5,09
		3	6,15	0,971	nd	6,09	0,971	5,31
(B) 2% lactato potásico y 0,3% diacetato de sodio	Lote 1	1	5,87	0,977	nd	5,84	0,976	4,42
		2	5,89	0,973	nd	5,85	0,974	4,68
		3	5,90	0,971	nd	5,87	0,970	4,55
	Lote 2	1	6,01	0,976	nd	5,97	0,975	4,62
		2	6,02	0,974	nd	5,98	0,973	4,10
		3	6,04	0,974	nd	6,00	0,975	4,51
	Lote 3	1	6,00	0,979	nd	5,96	0,980	4,48
		2	5,95	0,977	nd	5,91	0,977	4,72
		3	5,98	0,980	nd	5,95	0,978	4,37

nd: no detectado (< 1 log ufc/g)

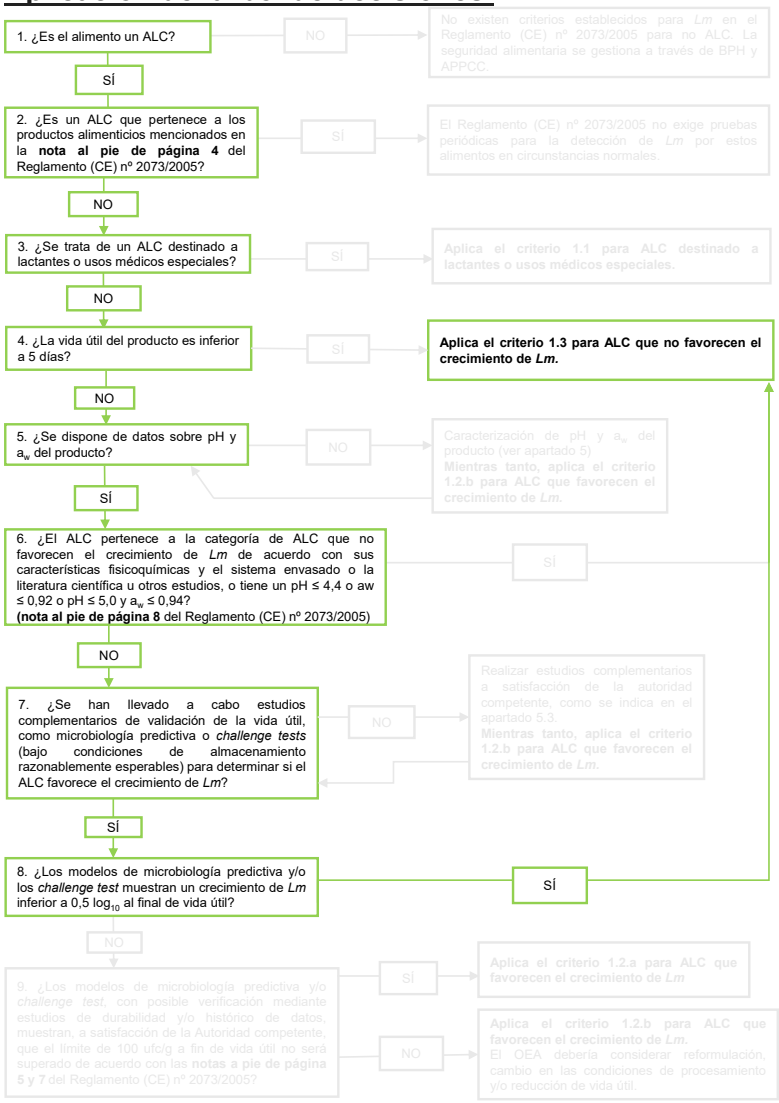
5. ALC QUE PUEDEN FAVORECER EL CRECIMIENTO DE *L.m.* ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS			
5.2. ENSAYOS DE DESAFÍO	**SÍ**	**NO**	**NO APLICA**
Se han realizado ensayos de desafío para valorar la capacidad de Lm para crecer en el alimento (potencial de crecimiento Δ). En caso de respuesta afirmativa, completar sección 5.2.1.	**x**		
Se han realizado ensayos de desafío para estimar los parámetros de crecimiento de Lm (tasa de crecimiento máximo, μ_{max}). En caso de respuesta afirmativa, completar sección 5.2.2.		**x**	
El laboratorio que realiza el ensayo dispone de garantías adecuadas de competencia técnica (p. ej., acreditación EN ISO/IEC 17025, controles de calidad, participación satisfactoria en ensayos de aptitud)	**x**		
El informe indica expresamente que el ensayo se ha diseñado y ejecutado conforme a la guía técnica del EURL-Lm sobre ensayos de desafío.	**x**		
Se describe de forma completa el producto (características fisicoquímicas, denominación,	**x**		

composición, sistema de envasado, peso/formato, tipo de producto, vida útil prevista, modo de conservación, instrucciones de uso, fecha de fabricación, etc.)				
Se ha evaluado la variabilidad intralote (mínimo 5 valores) e interlote (mínimo de 3 lotes diferentes) de aquellos factores relevantes del producto (p.ej. pH y a_w).			**x**	
Se describen las condiciones del proceso que puedan influir en el crecimiento de Lm (p. ej., tratamiento térmico, ahumado, secado, maduración, troceado, picado, salado, congelación, etc.)		**x**		
Se aporta información que demuestra que los lotes objeto de ensayo son representativos de la producción (al menos 3 lotes) y preferentemente representan el escenario menos favorable.		**x**		
Está justificado que se utiliza un solo lote porque la repercusión de la variabilidad interlote de los parámetros fisicoquímicos (pH, aw) sobre el crecimiento de *Lm* no es relevante.			**x**	
5.2.1. ENSAYOS DE DESAFÍO PARA EVALUAR EL POTENCIAL DE CRECIMIENTO (Δ)		**SÍ**	**NO**	
Para evitar cambios físico-químicos en el producto, ¿Se ha realizado la inoculación dentro de los 2 días posteriores a su fabricación?		**x**		
En caso de haber transcurrido más de 2 días desde la fabricación hasta la inoculación, ¿se justifica conforme a la guía técnica del EURL-Lm?				**x**
Se describe y justifica la elección de las cepas inoculadas (caracterizadas por origen y características de crecimiento)		**x**		
¿Los lotes se han inoculado con la misma mezcla de cepas?		**x**		
Se describe	la preparación del inóculo (subcultivos, condiciones, volumen total, etc.)	**x**		
	la concentración objetivo, siendo esta próxima a 100 ufc/g o ml (entre 50-200 ufc/g o ml) o, si se usa otra concentración, ¿se justifica técnicamente?	**x**		
La técnica de inoculación es adecuada al tipo de producto y al escenario realista de contaminación "natural" y se comprueba que no altera de forma relevante las propiedades del alimento. *Ej.: inoculación en "superficie" para reproducir contaminación cruzada desde superficie de cortadora; inoculación en "profundidad" para reproducir contaminación en productos sometidos a picado/amasado, etc.*		**x**		
¿El ensayo incluye también muestras de control (sin inocular) para ver la ocurrencia natural de *L. monocytogenes* en el producto?			**X** (ver obser	

			vacio nes)	
Se demuestra que la distribución del inóculo es homogénea en tiempo 0, de forma que la desviación estándar de las 3 unidades inoculadas es < 0,3 log ufc/g.		**x**		
Se ha inoculado y realizado recuento de *Listeria monocytogenes* en al menos 7 muestras por lote, 3* en tiempo 0 (tras inocular), 3 a lo largo de la vida útil y 1 al final? **Puede ser 1 si los 3 lotes se inoculan de manera simultánea.*		**x**		
Se ha realizado investigación de *Lm* en la muestra control obteniendo un resultado de no detección en 25 g (*si se detecta se puede seguir el ensayo siempre que el recuento sea inferior al obtenido en las muestras inoculadas*)			**X** (ver observaciones)	
Se han contemplado las condiciones razonablemente previsibles de:	Envasado (al vacío, atmósferas modificadas, etc.)	**x**		
	Temperaturas de almacenamiento en la industria (e.g. 7ºC)	**x**		
	Temperaturas de almacenamiento en el comercio al por menor (7ºC)	**x**		
	Temperaturas de almacenamiento por el consumidor (10ºC)		**x**	
En caso contrario, ¿se han conservado reproduciendo las condiciones razonablemente previsibles aportadas por el operador, justificadas por información detallada, estableciendo las mismas en el percentil 95 de sus observaciones?		**x**		
¿Se han medido en las unidades de control los parámetros fisicoquímicos fundamentales del producto (al menos pH y a_w) y se ha realizado control de temperatura y recuento de microbiota asociada?		**x**		
Los análisis de detección y recuento de Lm se han realizado utilizando los métodos de referencia (EN ISO 11290-1 y EN ISO 11290-2) o con métodos alternativos conforme al artículo 5 del Reglamento (CE) nº 2073/2005.		**x**		
Se incluyen los cálculos realizados para valorar el potencial de crecimiento y se interpretan correctamente: - **$\Delta > 0,5$ $\log_{10}$** implica que el alimento **favorece el crecimiento de *Lm*** - **$\Delta \leq 0,5$ $\log_{10}$** implica que **no favorece el crecimiento de *Lm***		**x**		
Conclusión:	**¿El ensayo de desafío aportado por la empresa proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no favorece el crecimiento de *Lm*?** En caso	**x**		

	negativo, indicar motivos en observaciones.			
	Si el producto favorece el crecimiento de Lm, ¿el ensayo de desafío proporciona evidencias que demuestran de manera satisfactoria que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante toda su vida útil? En caso negativo, indicar motivos en observaciones			**x**
Observaciones:	No se ha procedido a la investigación de la presencia de Lm en el lote de productos utilizados para realizar el *challenge test*. El nivel de inoculación es muy superior al que puede contaminarse el producto durante la exposición postletalidad. En este sentido, en la ISO 20971-1, esta verificación, no se exige.			

Aplicación del árbol de decisiones.



Pregunta 1: Sí

Pregunta 2: No

Pregunta 3: No

Pregunta 4: No

Pregunta 5: Sí

Pregunta 6: No

Pregunta 7: Sí

Pregunta 8: Sí

Conclusión

La caracterización fisicoquímica de la formulación base indica que el jamón cocido loncheado envasado al vacío puede favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* y, en ausencia de otras evidencias, se clasificaría en la categoría 1.2 del Reglamento (CE) n.º 2073/2005.

Mediante microbiología predictiva se diseñaron dos formulaciones potencialmente listeriostáticas: una con un 4 % de lactato potásico y otra con un 2 % de lactato potásico y un 0,3 % de diacetato sódico. Posteriormente, su eficacia se validó mediante ensayos de desafío realizados con tres lotes independientes y bajo un perfil de temperatura razonablemente previsible.

Los potenciales de crecimiento máximos obtenidos fueron de 0,45 $\log_{10}$ para la formulación A y de 0,30 $\log_{10}$ para la formulación B. Dado que ambos valores son inferiores o iguales a 0,5 $\log_{10}$, los resultados demuestran que las dos formulaciones no favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* en las condiciones evaluadas. En consecuencia, el producto puede clasificarse en la categoría 1.3 del Reglamento (CE) n.º 2073/2005.

El resultado de la verificación del estudio se considera **SUFICIENTE** para las formulaciones, el proceso de elaboración, el sistema de envasado y las condiciones de conservación evaluados. El operador deberá verificar periódicamente que la producción habitual mantiene las características fisicoquímicas y las concentraciones de conservantes utilizadas en el estudio, así como revisar su validez ante cualquier modificación relevante del producto, el proceso, el envasado o las condiciones de conservación.

Este documento, aprobado por la Comisión Institucional de la AESAN[1], refleja el criterio de las autoridades competentes en materia de seguridad alimentaria en España. Debe ser entendido en su integridad y nunca de modo parcial.

[1] La Comisión Institucional es el órgano colegiado de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición encargado de establecer mecanismos eficaces de coordinación y cooperación entre las Administraciones Públicas con competencias en materia de seguridad alimentaria y nutrición. Está integrada por representantes de los Ministerios de Derechos Sociales, Consumo y Agenda 2030, de Sanidad, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Ciencia, Innovación y Universidades, las Comunidades Autónomas, las ciudades de Ceuta y de Melilla y las entidades locales.