

Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo

Informe final de la actividad (Ref. 0404-I3020)
16-5-2014



AUTORES

Dra. Sara Bover i Cid, *investigadora del Programa de Seguridad Alimentaria del IRTA*
Dra. Margarita Garriga i Turón, *jefa del Programa de Seguridad Alimentaria del IRTA*

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

Finca Camps i Armet, s/n
17121 Monells
Tel. +34 630 052
Fax +34 630 373
www.irta.cat

Investigación sobre las condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo

INFORME FINAL DE LA ACTIVIDAD

Revisión: 5

Fecha: 25 de noviembre de 2014

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN REALIZADA CON:

Agència de Salut Pública de Catalunya.
C/ de Roc Boronat, 81-95 (Edifici Salvany)
08005 Barcelona

Persona de contacto IRTA: Sara Bover i Cid (sara.bovercid@irta.cat)
Persona de contacto ASPC: Victòria Castell (victoria.castell@gencat.cat)

Exención de responsabilidades

Este documento ha sido elaborado por el Programa de Seguridad Alimenticia del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA), por encargo de la Agencia de Salud Pública de Cataluña en el marco de un proyecto sobre las condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (Ref. 0404-I3020). En la elaboración de este documento se ha hecho todo lo posible para garantizar que la información sea correcta. No obstante, ni el IRTA ni ninguno de sus empleados asumen ninguna responsabilidad ni obligación en relación con los errores de hecho, omisiones, interpretaciones u opiniones relativos en relación a la información incluida en este documento.

AUTORES:

Sara Bover i Cid
Margarita Garriga i Turón

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción y marco legislativo	5
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	5
1.1.1. Características ecológicas	6
1.1.2. Fuentes de contaminación.....	13
1.2. Alimentos listos para el consumo.....	166
1.2.1. Definición.....	166
1.2.2. Procesos productivos	209
1.3. Criterios microbiológicos	21
1.3.1. Marco actual y sistema métrico de la gestión de riesgos microbiológicos	21
1.3.2. Criterios microbiológicos del Reglamento (CE) 2073/2005 en relación con <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos listos para el consumo.....	23
2. Factores determinantes del comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos listos para el consumo	29
2.1. Aspectos y factores clave para la categorización de los productos (favorece/no favorece el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>).....	29
2.1.1. Definición de “crecimiento” bacteriano.....	29
2.1.2. Criterios para la categorización del riesgo asociado a los alimentos listos para el consumo	31
2.1.3. Vida útil comercial respecto a vida útil segura	38
2.2. Herramientas para la categorización «favorece/no favorece» el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	39
2.2.1. Consulta de la bibliografía científica y histórico de datos	40
2.2.2. Modelos predictivos de crecimiento /no crecimiento (G/NG).....	42
2.2.3. Pruebas de inoculación (challenge test) para determinar el potencial de crecimiento.....	49
2.3. Herramientas para cuantificar la velocidad de crecimiento	51
2.3.1. Modelos predictivos cinéticos	51
2.3.2. Pruebas de inoculación (challenge test) para determinar la velocidad de crecimiento.....	60

3. Referencias bibliográficas	62
4. Anexos	69
Anexo 1. Funcionamiento de los planes de muestreo. Criterios microbiológicos.	69
Anexo 2. Control ambiental. Muestreo de superficies, recomendaciones.....	73
Anexo 3. Árbol de decisión sobre la aplicación de los criterios microbiológicos	75
Anexo 4. Características del crecimiento bacteriano	76
Anexo 5. Establecimiento y validación de la vida útil segura	78

1. Introducción y marco legislativo

1.1. *Listeria monocytogenes*

El género bacteriano llamado *Listeria* comprende bacilos grampositivos, anaerobios facultativos y catalasa positivos, con dos especies patógenas como *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, y otras no patógenas como *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*.⁶⁹ Recientemente se han identificado nuevas especies, en concreto *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. aquatica*, *L. floridensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. cornellensis* y *L. grandensis*.^{15b,19}

Listeria ivanovii se asocia a la patología de rumiantes y sólo se han descrito algunos casos esporádicos de listeriosis para esta especie en humanos.⁸¹ *Listeria monocytogenes* es la especie principalmente asociada con la aparición de listeriosis en humanos. Existen 13 serovares de *L. monocytogenes* que desde el 2005 se han reemplazado por 5 genoserogrupos.⁴³

La listeriosis es una infección oportunista que afecta con más frecuencia a la población de riesgo: personas mayores, niños, mujeres embarazadas y personas con el sistema inmunitario deprimido. La incidencia de listeriosis es relativamente baja en comparación con otras enfermedades asociadas a microorganismos alimentarios. Según los datos epidemiológicos de los últimos años en diversos países de la Unión Europea y en los Estados Unidos, la tasa anual media de listeriosis se sitúa en torno a los 0,3 casos/100.000 habitantes.^{35, 52} El último informe de EFSA sitúa la tasa de listeriosis del 2012 en 0,41 casos/100.000 habitantes.⁵⁴ España, sin embargo, es uno de los países con una incidencia más alta de listeriosis (0,91 casos/100.000 habitantes en el 2012), un valor entre 2 y 3 veces superior a la media de la Unión Europea.^{52, 54}

La forma invasiva de la infección por *L. monocytogenes* se asocia a una tasa de mortalidad alta (entre el 10% y el 50%, según la fuente). De acuerdo con el último informe de EFSA sobre zoonosis y brotes de toxii infecciones alimentarias,⁵⁴ los 198 casos fatales de listeriosis representaron el 65% de las muertes causadas por zoonosis confirmadas de 2012 (Figura 1).

La gravedad de la enfermedad convierte *L. monocytogenes* en uno de los patógenos alimenticios más relevantes.⁵⁴ Los costes, tanto a nivel de salud como económicos, asociados a la incidencia de listeriosis hacen que la minimización del riesgo de *L. monocytogenes* en productos listos para el consumo constituya uno de los principales objetivos que hay que tratar en materia de salud pública.^{76, 157} Desde hace unos cuantos años, los gobiernos, las autoridades sanitarias, los organismos tecnológicos y de investigación y también la industria alimentaria dedican numerosos esfuerzos a gestionar y minimizar el riesgo asociado a la presencia y crecimiento de *L. monocytogenes* en productos listos para el consumo.

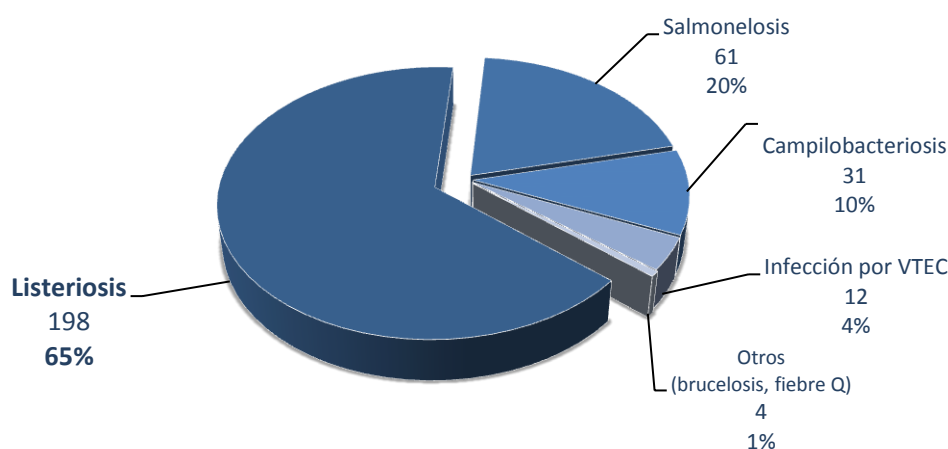


Figura 1. Distribución de las fatalidades (número y porcentaje) causadas por agentes zoonóticos en la Unión Europea durante 2012. Fuente: Informe EFSA (2014).⁵⁴

1.1.1. Características ecológicas

1.1.1.1 Crecimiento

Las condiciones ambientales en que *L. monocytogenes* puede crecer han sido motivo de numerosos estudios y revisiones bibliográficas.^{10, 12, 69, 94, 108, 118, 133} En la tabla 1 se resumen las principales características ecológicas de *L. monocytogenes* en relación con los límites de crecimiento. Los valores de los diferentes factores ambientales considerados constituyen condiciones límite cuando todos los otros factores se encuentran en valores óptimos para el crecimiento y contemplan un intervalo de valores debido a la variabilidad biológica (p. ej. diferencias entre cepas). En caso de que uno o diversos factores se encuentren en condiciones subóptimas del crecimiento, como generalmente sucede en los alimentos, el intervalo de condiciones que permitiría el crecimiento se estrecha.⁶¹ Entonces, los valores mínimos de los factores ecológicos a partir de los cuales se podría observar crecimiento de *L. monocytogenes* aumentan.

Taula 1. Características ecológicas en relación con el crecimiento de *L. monocytogenes*.^{69, 94, 133}

Condiciones de crecimiento ^a	Mínimo	Máximo	Óptimo
Temperatura (°C)	-2 a 4	~45	30 a 37
pH (HCl como acidulante)	4,2 a 4,3	9,4 a 9,5	7,0
a _w (NaCl como humectante)	0,90 a 0,93	> 0,99	0,97
Concentración de sal (% NaCl en fase acuosa)	< 0,5	12 a 16	-

^a: Los valores se refieren a condiciones óptimas de crecimiento en medio de laboratorio.

Listeria monocytogenes es una bacteria psicrotrofa, capaz de multiplicarse en un amplio intervalo de **temperaturas**. El límite inferior para el crecimiento de *L. monocytogenes* en matrices con un contenido alto de nutrientes y pH neutro se sitúa cerca de los 0 °C.⁹⁴ En los alimentos, las temperaturas mínimas de crecimiento se sitúan generalmente entre los 3 °C y los 4 °C,¹⁴¹ aunque se ha observado crecimiento a temperaturas inferiores (p. ej. -1,5 °C en un producto cárnico cocido y envasado al vacío).⁹² Sin embargo, a temperaturas de aproximadamente 0 °C, el crecimiento es muy lento, con un tiempo de generación de entre 62 y 131 h.⁹⁴ La dificultad para determinar la temperatura mínima de crecimiento de *L. monocytogenes* ha llevado a diversos investigadores estimar este valor cardinal mediante la modelización matemática. En estos casos, se ha estimado que la temperatura mínima de crecimiento se sitúa entre -6,6 °C y 0,5 °C, dependiendo de la cepa estudiada y de las condiciones experimentales ensayadas.^{12,141}

Las temperaturas de refrigeración que generalmente hay en el ambiente productivo y de conservación de los alimentos (4 °C 10 °C) favorecen la adaptación y la resistencia de *L. monocytogenes* a condiciones de calor y falta de nutrientes (fuentes de carbono), y también al estrés ácido, osmóticos y oxidativos.¹⁰⁸



La tolerancia de *L. monocytogenes* al frío y su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración es uno de los principales problemas para la industria y los establecimientos elaboradores, distribuidores y vendedores de alimentos listos para el consumo.

La temperatura óptima para el crecimiento de *L. monocytogenes* se sitúa entre los 30 °C y los 37 °C. Generalmente, el patógeno no es capaz de crecer a temperaturas superiores a 45 °C y los efectos letales se empiezan a observar entorno a los 50 °C.¹⁰⁸ Sin embargo, hace falta tener en cuenta que a temperaturas de entre 43 °C y 52 °C, *L. monocytogenes* puede activar mecanismos de respuesta a choques térmicos y favorecer de esta manera la generación de resistencias a otros tratamientos y condiciones posteriores.¹⁰⁸



Se tiene que evitar mantener los alimentos a temperaturas dentro del intervalo del choque térmico, porque se puede favorecer la resistencia de *L. monocytogenes* a tratamientos posteriores.

A diferencia de otros patógenos no esporulados, *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir largos periodos en condiciones desfavorables. Así, *L. monocytogenes* es capaz de resistir la congelación, tal como indican algunos estudios en diversos tipos de alimentos, en los cuales la

concentració del patògen se manté sin reducció aparente^{83, 126} o bé experimenta una lleugera reducció^{18, 65} durant la conservació en congelació (-18 °C y -20 °C).

El creixement òptim de *L. monocytogenes* se da a un **pH** pròxim a la neutralitat y una **activitat de aigua** (a_w) pròxim a 1. Ademés de su naturalesa psicrotròfa, esta bacteria destaca por su osmotolerancia y una notable capacidat de adaptar-se, crecer o sobreviure en condicions de estrés àcid.¹³⁶ En ausencia de otros factores limitadores, *L. monocytogenes* puede crecer en un amplio intervalo de valores de pH y a_w (Taula 1).

Aunque no se ha documentado el creixement con un pH inferior a 4,0, *L. monocytogenes* resiste valores de pH de entre 3,3 y 4,2. La viabilidad del patògen con un pH àcid depende de otros factores ambientales y de su estado fisiològic.¹⁰⁸

La disponibilidad de agua (a_w) de los alimentos está relacionada con la concentració de solutos (osmolaridad). *Listeria monocytogenes* no puede crecer en ambientes con a_w inferior a 0,90. Sin embargo, puede sobrevivir (p. ej. en embutidos madurados fermentados con a_w 0,85) durante largos periodos, especialmente en refrigeración.¹⁰⁸ También resiste concentraciones altas de sal, superiores a los 20% (como salmueras para la elaboración de embutidos cárnicos o quesos).^{69, 108, 136}



L. monocytogenes destaca por su naturalesa psicrotròfa, su osmotolerancia (tolera concentraciones altas de sal y/o a_w baja) y una notable capacidat de adaptar-se y sobreviure a condiciones de estrés àcid.



Un producto con a_w baja tiene efectos bacteriostáticos, pero si se mezcla o combina con otros productos o componentes con a_w más alta puede haber creixement de *L. monocytogenes*.
En este sentido, las salmueras son fuente de contaminación que, al combinarse con materia prima con a_w alta, permiten el creixement de *L. monocytogenes*.

Aunque la temperatura, el pH y el a_w son los factores generalmente más importantes, en determinados casos toman relevancia otros factores como la composición de la atmósfera y la presencia de determinadas sustancias antimicrobianas y/o conservantes.

Listeria monocytogenes crece de manera óptim en condiciones de **microaerofilia**, pero puede crecer bien en condiciones aeróbicas y también anaeróbicas. Puede crecer en concentraciones relativamente elevadas de dióxido de carbono (p. ex. 30%). Aunque, en refrigeración, la

presencia de CO₂ retarda el crecimiento de *L. monocytogenes*,¹³³ se necesita un 100% de CO₂ para inhibirlo.¹¹⁸

La presencia y la concentración de **substancias conservantes** afecta el crecimiento de *L. monocytogenes*. En el caso de los ácidos orgánicos débiles y sus sales, la actividad inhibitoria se relaciona con la acidificación del pH intracelular y la afectación de reacciones metabólicas. La acción de los ácidos orgánicos se produce por medio de su forma no disociada, por la que las concentraciones mínimas inhibitorias se calculan para esta forma activa. La [Tabla 2](#) recoge los valores descritos en los estudios publicados en relación con la concentración mínima inhibitoria (MIC, del inglés *minimal inhibitory concentration*) para diferentes ácidos orgánicos, además de otros compuestos antimicrobianos utilizados en la elaboración de alimentos listos para el consumo, como el fenol (componente del humo) y el nitrito (componente de las sales de curación).

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (MIC, *minimal inhibitory concentration*) de sustancias conservantes contra el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Substancia	FAO (2004) ⁶¹	Augustin <i>et al.</i> (2005) ¹¹	Augustin i Carlier (2000) ¹²	Mejlholm i Dalgaard (2009) ^{116, 117}
Ácido láctico ^a	3,8-4,6 mM		5,4 mM	3,79 mM
Ácido acético	~20 mM		20,1 mM	10,3 mM
Diacetato				4,8 mM
Ácido benzoico ^a			0,7 mM (benzoato sódico)	0,35 mM
Ácido cítrico ^a	~3 mM		1,6 mM	2,12 mM
Ácido sórbico ^a			5,1 mM (sorbato potásico)	1,90 mM
Fenol		31,9 ppm	12,5 ppm	32 ppm
Nitrito ^a	8,4-14,4 μM	25 μM	11,4 μM	350 ppm

^a: MIC calculada para la forma no disociada.

1.1.1.2 Supervivencia y inactivación

Listeria monocytogenes es relativamente resistente en comparación de otras bacterias patógenas no esporulats, con lo cual es el patógeno de relevancia y preocupación en productos listos para el consumo, especialmente los mínimamente procesados. En este tipo de alimentos, *L. monocytogenes* a menudo constituye el peligro microbiológico de referencia para

evaluar la eficacia de las estrategias de intervención, medidas de control y procesos de conservación, especialmente los que implican tratamientos térmicos de pasteurización.^{47, 108}

La **resistencia térmica** de *L. monocytogenes* ha sido ampliamente estudiada y revisada.^{13, 34, 47, 120, 150, 151} La resistencia de *L. monocytogenes* a tratamientos térmicos moderados (alrededor de 60 °C) es superior a la de otros patógenos como *Salmonella*, mostrando tiempos de reducción decimal (el llamado valor *D*) sustancialmente superiores.^{88, 108} A partir de 70 °C, los tiempos de reducción decimal de *L. monocytogenes* se igualan o incluso son inferiores a los de *Salmonella*, lo que indica que *L. monocytogenes* es más sensible a los incrementos de temperatura, es decir, presenta valores *z* (constante de resistencia térmica) inferiores.

En términos generales, y aplicando un margen de seguridad conservador (*safe harbor*), se considera que el tiempo de reducción decimal a la temperatura de referencia de 70 °C (*D*₇₀) para *L. monocytogenes* es del orden de 0,33 min y el valor *z* se sitúa entre 6 y 7,5. Con estos valores, se estima que los valores de pasteurización, para reducir 6 unidades logarítmicas la carga del patógeno, se lograrían aplicando 70 °C durante 2 min o bien una letalidad equivalente.^{34, 48, 60}

Sin embargo, las características fisicoquímicas y de composición de la matriz alimenticia influyen notablemente en la resistencia de los microorganismos a los tratamientos térmicos. En general, los medios ácidos favorecen la letalidad del proceso. Al contrario, una concentración alta de solutos (i.e. una *a_w* baja) protege *L. monocytogenes* frente los tratamientos térmicos.^{108, 151} En la [se muestra](#) el intervalo de valores razonablemente previsible de los parámetros de resistencia de *L. monocytogenes* en alimentos, recogidos en la guía elaborada por la *Campden and Chorlewood Food Research Association* sobre la pasteurización de los alimentos.³⁴

Tabla 3 se muestra el intervalo de valores razonablemente previsible de los parámetros de resistencia de *L. monocytogenes* en alimentos, recogidos en la guía elaborada por la *Campden and Chorlewood Food Research Association* sobre la pasteurización de los alimentos.³⁴

Tabla 3. Parámetros de resistencia térmica de *L. monocytogenes* en alimentos.³⁴

	Valores D_T^a (minutos)	Valores z^b (°C)
Carnes	$D_{55} = 8,15$ a $36,91$ min $D_{60} = 0,99$ a $8,32$ min $D_{65} = 0,48$ a $1,41$ min $D_{70} = 0,0063$ a $0,20$ min	5,05 a 7,39
Otras matrices	$D_{60} = 0,23$ a $13,70$ min $D_{65} = 0,27$ a $1,18$ min $D_{70} = 0,05$ a $0,27$ min	4,9 a 10,8

^a: D_T es el tiempo de reducción decimal, es decir, el tiempo a una determinada temperatura (T) necesario para reducir en un 90% (1 log) el número de células vegetativas.

^b: z es la constante de resistencia térmica, definida como el incremento de temperatura necesario para reducir en un 90% el valor D_T .

En la metanálisis publicada por Van Asselt y Zwietering se determinan parámetros globales y conservadores de inactivación térmica en diferentes patógenos, incluyendo *L. monocytogenes*, en alimentos.¹⁵⁰ Según este estudio, la media de D_{70} para *L. monocytogenes* en diversos tipos de alimentos se sitúa en 0,087 min (0,52 min si se considera el límite superior del intervalo de confianza de la predicción, que podría ser el valor conservador). En matrices con un 10% de sal, los valores se incrementan notablemente y el tiempo medio de reducción decimal se alargaría hasta 1,51 min (6,03 min como límite conservador).

Con el desarrollo y los avances en tecnologías nuevas o emergentes de conservación, en el procesamiento de los alimentos listos para el consumo toman relevancia **tecnologías no térmicas**. Entre las tecnologías emergentes implantadas comercialmente destaca el procesamiento por **altas presiones** (también denominada *pasteurización fría* o *pascalización*), para su uso cada vez más extendida en el sector de los alimentos listos para el consumo.^{23, 77, 144} La resistencia a la presión de *L. monocytogenes* ha sido objeto de estudio de numerosos trabajos; en la **Tabla 4** se muestran algunas de los datos recogidos en el informe elaborado por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.²

Tabla 4. Reducciones logarítmicas de *L. monocytogenes* per tratamientos de alta presión recogidas en el informe de la AESAN.²

Nivel de presión ^a	En medio de laboratorio (solución tamponada)	En matrices alimentarias
200 MPa	0,4	-
300 MPa	1	-
400 MPa	4-7	1-3
500 MPa	6-9	3-6
600 MPa	> 10	

^a: tratamientos de 15 min de duración

En el procesamiento por altas presiones, la presión se distribuye isostéticamente, es decir, de manera instantánea y uniforme, independientemente de la forma y el tamaño del producto presurizado.¹³⁰ Así, a diferencia de los tratamientos térmicos, en el procesamiento por altas presiones no hay zonas sobretratadas ni infratratadas. Sin embargo, los efectos letales de las altas presiones sobre los microorganismos en general, y en particular sobre *L. monocytogenes*, son extremadamente dependientes de las características fisicoquímicas de la matriz. Igual que para los tratamientos térmicos, las matrices ácidas favorecen la letalidad del proceso, mientras que una actividad de agua baja tiene un efecto protector importante. En matrices líquidas (con a_w muy alta), los tratamientos utilizados habitualmente por la industria alimenticia (de la orden de 600 MPa, entre 3 y 10 min) producen reducciones de los niveles del patógeno de más de 7 unidades logarítmicas (p. ej. en leche entera⁴⁰, zumos de fruta⁵⁶ o soluciones tamponadas¹³²). Las presiones del mismo orden logran una letalidad de 5-6 reducciones logarítmicas en matrices sólidas con a_w moderadamente alta (productos cárnicos cocidos⁸⁹ y productos de la pesca⁷). En cambio, las reducciones son notablemente inferiores en productos con a_w baja, p. ex., del orden de 3 unidades logarítmicas en pernil curado,²² o incluso inexistentes en matrices liofilizadas.⁸⁴



La resistencia térmica y las altas presiones de *L. monocytogenes* depende en gran medida de la matriz alimentaria donde se encuentra. En determinados casos (p. ex. alimentos con a_w reducida), el alimento podría proteger el patógeno y disminuir la efectividad de los tratamientos. Los valores de pasteurización y el alcance de la letalidad requerida se han de ajustar y validar para el tipo y características del producto.

Valores bajos de pH, a_w reducida o la presencia de determinadas concentraciones de sustancias antimicrobianas, además de los efectos bacteriostáticos, pueden tener efectos bactericidas contra *L. monocytogenes*. La **inactivación química** de *L. monocytogenes*, en términos de disminución de la viabilidad celular, depende del nivel de aplicación del factor,

pero se ve muy influenciada por las otras condiciones ambientales^{114,133}. En este sentido, la temperatura es clave y hay que tenerla en cuenta en la evaluación de la supervivencia no térmica. Generalmente, a temperaturas de refrigeración, los efectos bactericidas de los factores ambientales no térmicos son menores que los observados a temperaturas más próximas a las condiciones óptimas de crecimiento¹³³.

Este fenómeno se explica por el mismo mecanismo de la teoría de barreras u obstáculos antimicrobianos desarrollada por Leistner a los años ochenta.¹¹¹ Bajo los efectos de la combinación de factores antimicrobianos (es decir, la tecnología de barreras, *hurdle technology*), los microorganismos prueban todos los recursos fisiológicos homeostáticos disponibles para intentar superar el ambiente hostil. En hacerlo, se agotan energéticamente y acaban muriendo. Cuando las condiciones que impiden el crecimiento de los microorganismos comprometen también la viabilidad, causan a la muerte celular. La velocidad de muerte es superior si las células están dañadas subletalmente o bien si la temperatura se acerca a la óptima del crecimiento.



El estudio de la eficacia de los factores intrínsecos (p. ej. acidez, a_w baja, concentración de conservantes, etc.) se tiene que realizar en condiciones reales de refrigeración. Los ensayos acelerados a temperatura ambiente generalmente sobreestiman la actividad listericida y no son adecuados para el estudio de la vida útil de los productos microbiológicamente perecederos.

1.1.2. Fuentes de contaminación

El género *Listeria* en general, y *L. monocytogenes* en particular, se considera ubicuo, extensamente distribuido en una amplia diversidad de ambientes donde es capaz de sobrevivir en condiciones desfavorables e incluso multiplicarse en medios nutricionalmente simples, con lo cual puede colonizar superficies y equipamientos y persistir durante largos periodos^{94, 136}.

Hay muchos artículos que describen su presencia en el medio ambiente (suelos, tierras de cultivo, prados, campos de pasto, otro material vegetal, agua, ríos y aguas residuales), en granjas, forraje y pienso por alimentación animal, y también en el ambiente de procesamiento de los alimentos, incluyendo la industria y establecimientos de elaboración, preparación y venta de alimentos (p. ej. paredes, tierras, desagües, techos, equipamientos, herramientas, etc.).^{69, 136} También se ha demostrado la presencia de portadores sanos, animales y humanos.⁶⁹

La ubicuidad, resistencia y capacidad de supervivencia de *L. monocytogenes* en ambientes desfavorables hace que los reservorios y los nichos ecológicos sean numerosos, con la consiguiente relevancia en cuanto a las fuentes de contaminación y fenómenos de transmisión y diseminación del patógeno en los alimentos (Figura 2).

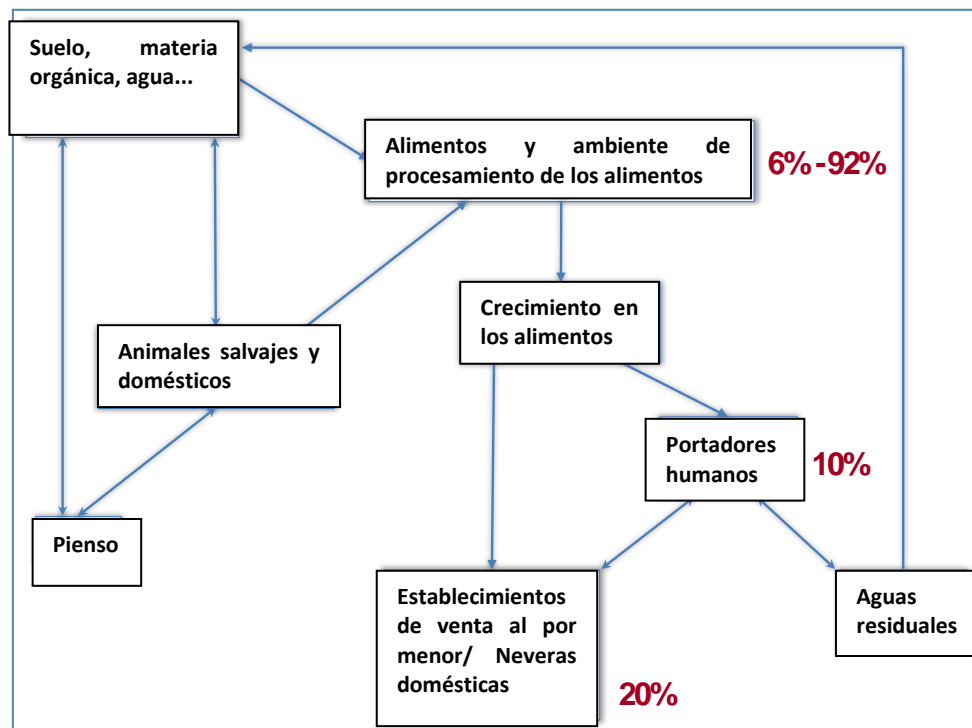


Figura 2. Rutas de diseminación de *L. monocytogenes* en alimentos. En rojo se indica el porcentaje de incidencia de *L. monocytogenes* según la revisión de Warriner y Namvar (2009).¹⁵⁷

En el ámbito de la industria y los establecimientos de elaboración de los alimentos, las fuentes potenciales de contaminación por *L. monocytogenes* son numerosas (Tabla 5). Los avances en las técnicas analíticas, de identificación y tipificación molecular de *L. monocytogenes* han permitido demostrar la presencia de clones específicos adaptados a las condiciones ambientales de las plantas de procesamiento, especialmente en instalaciones refrigeradas, aunque se limpien y desinfecten rutinariamente.^{30, 76, 102, 124, 143} Esta capacidad de persistencia se asocia a la capacidad de *L. monocytogenes* para adherirse a diferentes tipos de superficies (incluyendo el poliestireno, polipropileno, vidrio, acero inoxidable, cuarzo, mármol y granito) y formar biofilmes. Éstos, conocidos también como películas biológicas, son agregados celulares complejos de unas o más especies microbianas que se adhieren entre ellas y/o a superficies o interfases mediante una matriz formada predominantemente por polímeros extracelulares. Los biofilmes protegen los microorganismos de la acción de las radiaciones ultravioleta, ácidos, sustancias antimicrobianas, salinidad y desecación y, por lo tanto, disminuyen la eficacia de los procedimientos de desinfección y descontaminación.^{3, 74, 127} Consiguientemente, la presencia y persistencia de *L. monocytogenes* en forma de biofilmes son los principales responsables de las recontaminaciones o contaminaciones cruzadas que se dan en el procesamiento de alimentos listos para el consumo y, por lo tanto, es también uno de los principales focos de atención en la gestión del riesgo a nivel operacional.³

Tabla 5. Fuentes potenciales de contaminación para *L. monocytogenes* asociadas a las plantas de producción de alimentos listos para el consumo.^{142, 146}

Categoría	Fuentes potenciales de <i>L. monocytogenes</i>
A. Ingredientes	<ul style="list-style-type: none"> · Materias primas, alimentos crudos: <ul style="list-style-type: none"> · carne y pescado · leche · vegetales (frutas y verduras)
B. Coadyuvantes/auxiliares tecnológicos	<ul style="list-style-type: none"> · Aire comprimido · Gel · Soluciones salinas utilizadas en la refrigeración de los alimentos listos para el consumo
C. Superficies que entren en contacto con alimentos listos para el consumo refrigerados	<ul style="list-style-type: none"> · Cintas transportadores fibrosas y porosas · Equipo de envasado y llenado · Cintas, peladoras y colectores · Contenedores, bandejas, cestos, tubos, etc. · Rebanadoras, picadoras, trituradoras, mezcladoras, pasteras · Utensilios diversos, cuchillos, tablas de cortar, etc. · Guantes
D. Superficies que no entran en contacto con alimentos listos para el consumo refrigerados	<ul style="list-style-type: none"> · Básculas de suelo · Mangueras · Cavidades cilíndricas de los transportadores · Armazón de equipos · Armazones mojados, oxidados o con cavidades · Cojinetes vistos de los equipos · Filtros de aire comprimido · Condensación de cubetas de goteo · Carcasas de motores · Útiles de mantenimiento (llave inglesa, etc.) · Montacargas, toros, carretillas... · Interruptores · Aspiradores, palos de fregar, bayetas · Cubos de basuras y otros artículos auxiliares · Utensilios para la limpieza de equipos (cepillos, estropajos, etc.) · Congeladores en espiral i en túnel · Máquina de hielo · Delantales
E. Ambiente de planta	<ul style="list-style-type: none"> · Suelos, paredes, desagües · Techos, estructuras elevadas, pasarelas · Áreas de limpieza (pilas), condensaciones y agua estancada · Aislamiento mojado o húmedo de paredes, cañerías y sistemas de refrigeración · Juntas de goma de las puertas, especialmente de los refrigeradores · Contenido de los aspiradores

En los últimos años, son diversas las opiniones que indican que los establecimientos de preparación y venta al detalle de alimentos listos para el consumo tendrían una especial relevancia y responsabilidad como origen potencial de las contaminaciones por *L.*

monocytogenes y, en último término, en la incidencia de listeriosis. Algunos estudios sobre la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, preparados (rebanados y envasados) en el punto de venta, muestran que la prevalencia del patógeno es superior al observado en productos rebanados y envasados en instalaciones industriales, generalmente con condiciones higiénicas más controladas, y atribuyen el origen de listeriosis.^{90, 112, 147} Evaluaciones de riesgo sobre listeriosis en productos cárnicos listos para el consumo atribuyen la mayoría de casos de listeriosis (60%-83%) a contaminaciones originadas en el punto de venta.^{55, 129}

La prevalencia y los niveles de contaminación por *L. monocytogenes* de los alimentos crudos (p. ej. materias primas utilizadas para elaborar los alimentos listos para el consumo) es muy variable. También lo es la prevalencia y los niveles de contaminación en los alimentos listos para el consumo, sea a la salida de fábrica o en los puntos de venta hasta el final de la vida útil. En los últimos años se han publicado muchos trabajos y revisiones que proporcionan datos de prevalencia y, ocasionalmente, de niveles de contaminación.^{8, 53, 54, 75, 78, 79, 109, 121, 123, 149, 155}

1.2. Alimentos listos para el consumo

1.2.1. Definición

Un *alimento listo para el consumo*, según el Reglamento (CE) 2073/2005 (artículo 2, gr) se define como un alimento destinado por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinarlo ni de ningún otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos.

El productor o fabricante tiene que decidir, dentro de los procedimientos del APPCC, si el producto está listo para ser consumido como tal o necesita algún tipo de tratamiento previo que elimine el riesgo asociado a *Listeria monocytogenes*. En cualquier caso, es importante documentar la decisión de si el alimento tiene la condición «listo para el consumo» o no. A la Hora de determinar la condición de listo para el consumo de un alimento, el productor tiene que considerar si el producto se someterá a:⁶⁷

- a) Cocción (por el consumidor, restaurador, etc.) antes de ser consumido. En este caso, el producto no se considerará listo para el consumo si se incluyen las instrucciones de cocción (es decir, la combinación de tiempo y temperatura) en el etiquetado y estas instrucciones han sido validadas para asegurar que el peligro microbiológico se elimina o reduce a un nivel aceptable. En caso de ambigüedad sobre la necesidad de cocinar antes de consumir, el producto se tendría que considerar listo para el consumo.

- b) Recalentamiento (por el consumidor, restaurador, etc.) antes de ser consumido para mejorar la palatabilidad y no para eliminar el riesgo microbiológico. En este caso, los productos se consideran listos para el consumo, se hayan envasado previamente o no.
- c) Procesamiento adicional en etapas posteriores de la cadena alimenticia (pasteurización, esterilización, etc.). En este caso, si el procesado posterior es efectivo para eliminar o reducir el peligro microbiológico a un nivel aceptable, el producto comercializado no se considera listo para el consumo.

En la **Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.** se muestra el árbol de decisiones que ilustra las indicaciones descritas por la Food Safety Authority of Ireland (FSAI).⁶⁷

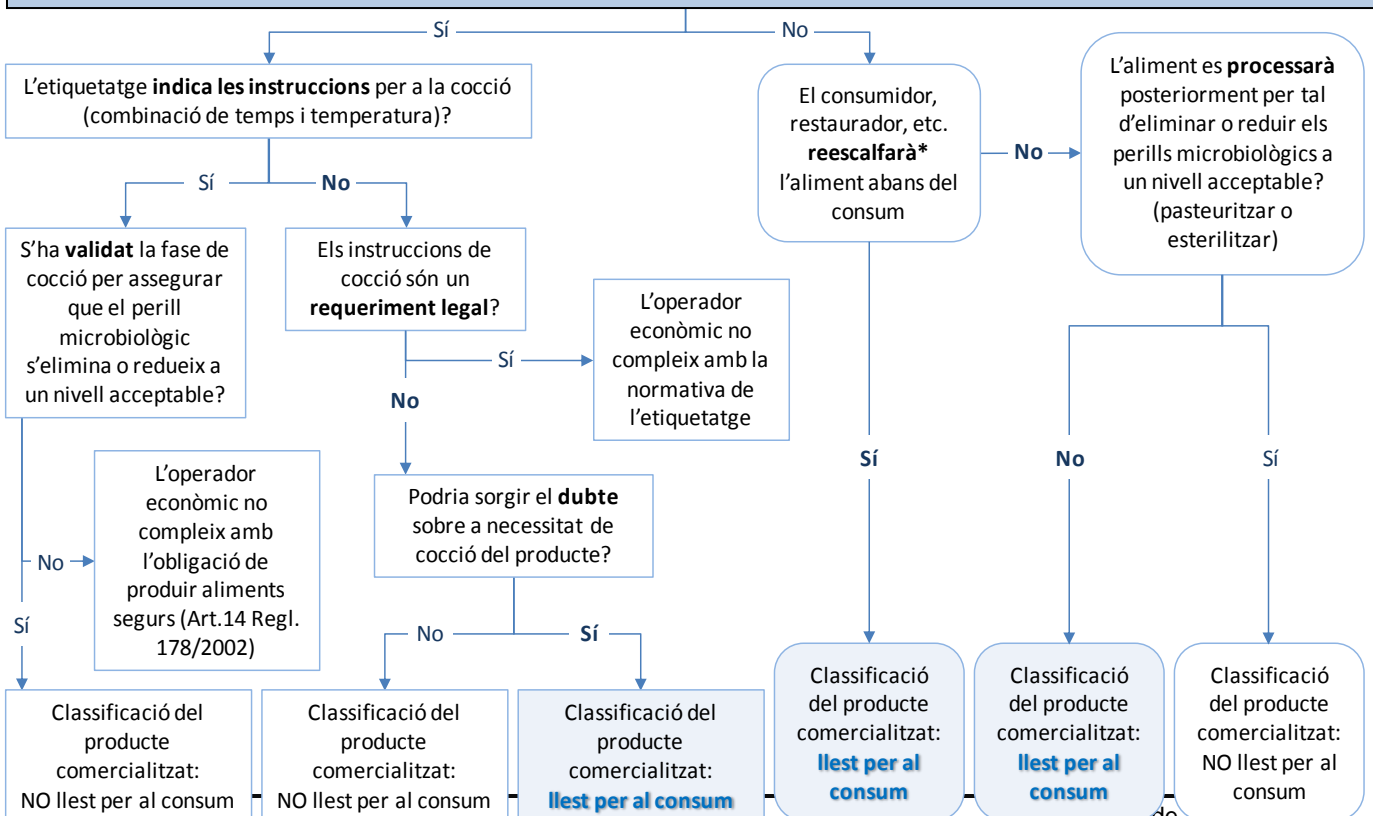


En caso de que el alimento, antes de ser consumido, se tenga que cocer completamente o procesar de forma efectiva por eliminar *L. monocytogenes*, hay que validar las condiciones de tiempo y temperatura necesarias para garantizar la seguridad alimenticia y hay que indicarlas claramente en el etiquetado.

Sin embargo, hace falta tener en cuenta que el Reglamento (CE) 2073/2005 requiere que los productores adopten medidas para garantizar el cumplimiento de los criterios microbiológicos en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenaje y utilización.⁴¹ Este último punto, el de las condiciones previsibles de utilización, podría llevar a interpretar que, en caso de que sea razonablemente previsible que el consumidor no respete las instrucciones de cocción indicadas, el producto se tendría que considerar listo para el consumo y, en consecuencia, serían de aplicación los criterios de seguridad alimenticia para *L. monocytogenes*.

Este aspecto es especialmente relevante en determinados alimentos compuestos y/o en platos preparados elaborados a partir de otros productos (crudos o cocidos) que no necesitarían cocción para ser consumidos o que, individualmente, se consumen sin cocción. Éste podría ser el caso, por ejemplo, de las pizzas envasadas y refrigeradas. Aunque el etiquetado incluya instrucciones para la cocción completa, es razonablemente posible y previsible que el consumidor caliente el producto con el objetivo de hacerlo más agradable en el paladar, por ejemplo hasta fundir el queso, pero sin llegar a cocerlo completamente.⁴² En este caso, por lo tanto, sería prudente y relevante considerar el producto como alimento listo para el consumo, tal como se indica en el modelo genérico de APPCC propuesto por la administración canadiense.⁶

El consumidor o restaurador ha de cocinar completamente el alimento antes de consumirlo



* Reescalfament amb finalitats organolèptiques (millora de la palatabilitat) no per l'eliminació del risc microbiològic



Los alimentos para los cuales antes del consumo se recomienda calentarlos o regenerarlos (ready-to-heat) o acabarlos de cocinar (ready-to-endcook), por motivos de palatabilidad o con finalidades estéticas, culinarias o gastronómicas, pero no específicamente diseñadas para garantizar la seguridad microbiológica, se tienen que considerar listo para el consumo.

De hecho, esta interpretación estaría en línea con la definición de alimento listo para el consumo formulada por organismos de otros países. Por ejemplo, para la administración norteamericana, un alimento listo para el consumo es un alimento que se encuentra en estado comestible sin más preparació,⁶³ que normalmente se consume sin cocción o que razonablemente parece apto para el consumo sin cocción para garantizar la seguridad,¹⁴⁶ aunque puede recibir preparaciones adicionales con finalidades culinarias, gastronómicas, estéticas o de palatabilitat.⁷³ El Food Safety and Inspection Service espera que los alimentos cocidos y no autoestables se consideren como a listos para el consumo, rasgo que las instrucciones del etiquetado para una completa (re-) cocción antes del consumo se hayan validado y aclaren al consumidor que el producto se tiene que cocer por razones de seguridad, y no sólo de palatabilitat.⁷¹

En el Canadá, los alimentos listos para el consumo son alimentos que no requieren más preparación antes del consumo, excepto una limpieza o aclarado, descongelación o calentamiento. Los productos procesados que tienen una apariencia de cocidos (pero que no están completamente cocidos) se pueden considerar listos para el consumo si a las instrucciones para cocinarlos se considera el microondas o las instrucciones se refieren sólo a calentar y servir.⁸⁵

1.2.2. Procesos productos

Dentro de la definición de alimentos listos para el consumo se incluyen muchos productos animales (lácteos, cárnicos y productos de la pesca) y vegetales (frutas y verduras), incluyendo productos compuestos. Los procesos productivos para la elaboración de los alimentos listos para el consumo son muy diversos y, por lo tanto, las diferencias entre los procedimientos, las formulaciones y las características de los productos finales de diferentes fabricantes pueden ser considerables incluso para una misma tipología de productos.

Desde la perspectiva de la seguridad alimenticia y, más concretamente, asociado al riesgo de contaminación y/o crecimiento de *L. monocytogenes*, los puntos y etapas relevantes se podrían resumir en los que aparecen en la [Figura 3](#). Según el producto y el proceso productivo, se aplicarán más o menos etapas.



Figura 3. Procesos productivos de los alimentos listos para el consumo con un impacto relevante en el nivel de peligro (*L. monocytogenes*) del producto final.

En general, se considera que los tratamientos que reduzcan la concentración del patógeno al menos 5 o 6 unidades logarítmicas (según el tipo de producto) consiguen reducir el riesgo asociado a la presencia de *L. monocytogenes* hasta un nivel aceptable. A efectos prácticos, estos procesos eliminarían el riesgo (p. ej. pasteurización). En el caso de procesos con un menor impacto en la carga del patógeno, la magnitud de la reducción o efecto listericida puede ser muy variable y depende principalmente del tipo de proceso, del producto y de los parámetros de procesamiento aplicados. En determinadas circunstancias, la reducción podría ser poco o nada relevante desde el punto de vista microbiológico. Incluso, se podría dar el caso que *L. monocytogenes* pudiera crecer durante los primeros días de los procesos de fermentación, si los valores de pH y aw lo permiten ¹⁰¹. Por otra parte, sin embargo, las características del producto resultante podrían ejercer efectos bacteriostáticos, contribuyendo a la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* durante la conservación a lo largo de la vida útil del producto.

En cualquier caso, el control de *L. monocytogenes* pasa por un esfuerzo continuo a la hora de diseñar e implantar correctamente un programa de prevención basado en las buenas prácticas

de higiene y fabricación y, en definitiva, del sistema de APPCC. La aplicación de procesos productivos con el objetivo de reducir los niveles del patógeno, o bien limitar o evitar su crecimiento, no se ha de utilizar para compensar fallos o un relajamiento de las buenas prácticas de higiene y fabricación.



Los procesos productivos que constituyen medidas de control destinadas a reducir los niveles de patógeno (tratamientos bactericidas) o limitar el crecimiento (tratamientos bacteriostáticos) no se tienen que utilizar para solucionar deficiencias en las prácticas de higiene, prerequisites y APPCC.

1.3. Criterios microbiológicos

1.3.1. *Marco actual y sistema métrico de la gestión de riesgos microbiológicos*

En el ámbito institucional, los programas y actuaciones enfocadas a garantizar la seguridad alimenticia se plantean sobre la base del análisis de riesgos, que incluye la evaluación, la gestión y la comunicación de los riesgos. Éste constituye el marco global para poder estimar la relevancia de un determinado patógeno para la salud pública, definir un nivel apropiado de protección de la población (ALOP, del inglés Adequate Level Of Protection) contra el patógeno y establecer directrices para garantizar la seguridad alimenticia.^{80, 139}

El concepto ALOP se adoptó a mediados de los noventa en el acuerdo de medidas sanitarias y fitosanitarias (SPS) de la Organización Mundial del Comercio.¹⁵⁸ Sin embargo, el ALOP, expresado normalmente en términos de incidencia de una determinada enfermedad, no es útil para la gestión de la seguridad alimenticia en el ámbito operacional (elaboradores de alimentos). Por eso, en el marco del análisis de riesgos se han definido otros conceptos que componen el actual sistema de medida de la seguridad microbiológica de los alimentos, y que se describen en la Tabla 6.^{27, 95}

Este sistema, gracias a los avances en la evaluación cuantitativa de los riesgos microbiológicos, permite relacionar de manera más efectiva las actividades y acciones de control que tienen que llevar a cabo los productores para garantizar la seguridad alimenticia de los alimentos que

elaboran y comercializan, con el impacto que comportan para la salud y la protección del consumidor.^{139, 152}

Taula 6. Descripción de los conceptos que componen el actual sistema de medida de la seguridad microbiológica de los alimentos basado en el análisis de riesgos. Adaptado de Gorris (2005).⁸⁰

Concepto	Definición	Ejemplo
Nivel adecuado de protección ALOP <i>Adequate Level Of Protection</i>	Nivel de protección que una región o país está dispuesta a aceptar para su población en relación con la seguridad alimentaria	Incidencia anual de listeriosis < 0,3/100.000 habitantes
Objetivo de seguridad alimentaria FSO <i>Food Safety Objective</i>	Nivel máximo (frecuencia o concentración) de un peligro en un alimento en el momento de su consumo que proporciona o contribuye a lograr el ALOP	<i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos listos para el consumo ≤ 100 UFC/g al final de la vida útil establecida
Objetivo de rendimiento/funcionamiento PO <i>Performance Objective</i>	Nivel máximo (frecuencia o concentración) de un peligro en un alimento en una etapa específica de la cadena alimentaria antes de su consumo que contribuye a la consecución del FSO y, por tanto, del ALOP	<i>Listeria monocytogenes</i> en materias primas para la elaboración de embutidos fermentados ausencia/25 g
Criterio de rendimiento/funcionamiento PC <i>Performance Criterion</i>	Efecto en el nivel de un peligro que se ha de lograr por aplicar una o más medidas de control, a fin de cumplir los objetivos (FSO y PO) fijados	Tratamiento térmico (pasteurización) para lograr 6 reducciones logarítmicas de <i>L. monocytogenes</i>
Criterios de proceso o producto <i>Process or product criteria</i>	Parámetros de control de una medida de control para asegurar el cumplimiento del PC establecido	70 °C durante 2 min, en el punto más frío del producto y colocado en el lugar más frío del equipo de pasteurización

Para la industria alimenticia, esta perspectiva ofrece flexibilidad a la hora de diseñar, validar y establecer equivalencias de las medidas de control, es decir, de las acciones o actividades utilizadas para prevenir, eliminar o reducir un peligro a un nivel tolerable, compatible con el objetivo de seguridad alimenticia (FSO) establecido.¹³⁹

Entre los elementos que determinan el cumplimiento de un determinado FSO está el nivel de contaminación inicial del producto, y las posibles reducciones e incrementos que pueda sufrir durante la elaboración, distribución, venta y conservación del alimento hasta el momento de su consumo, tal como ilustra la inecuación propuesta por la International Commission donde | dónde Microbial Specifications for Food:⁹⁵

$$H_0 - R + I \leq FSO$$

Donde: H_0 es el nivel inicial de peligro, R es la reducción del peligro (por eliminación o destrucción) al largo de la cadena alimentaria y I es el incremento del peligro (por recontaminación y/o crecimiento del patógeno) al largo de la cadena alimentaria hasta el momento del consumo.

En este marco, los FSO sirven de base para establecer los criterios microbiológicos, que constituyen los límites legales para establecer la aceptabilidad de los productos y lotes de producción, en más de ser de utilidad para verificar los procesos y procedimientos, y en general el buen funcionamiento de las medidas de control, dentro del sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) de las industrias y establecimientos implicados en la elaboración y manipulación de los alimentos.

1.3.2. *Criterios microbiológicos del Reglamento (CE) nº 2073/2005 en relación con Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo*

El establecimiento y aplicación de criterios microbiológicos se considera una medida de gestión para minimizar el riesgo para los consumidores.⁴⁹ Actualmente se acepta que el análisis del producto final no garantiza, por sí solo, la seguridad de los alimentos a causa de las limitaciones asociadas al muestreo, el análisis y la distribución heterogénea de los microorganismos en los alimentos. Por lo tanto, la seguridad de los alimentos se garantiza principalmente con un enfoque preventivo, como la adopción de buenas prácticas de higiene y la aplicación de los procedimientos basados en los principios del APPCC. En este marco, los criterios microbiológicos se pueden utilizar en la validación y verificación de los procedimientos de APPCC y otras medidas de control de la higiene.⁴¹

Un criterio microbiológico define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos y/o en la cantidad de sus toxinas o metabolitos, por unidad de demasiado, volumen, superficie o lote. En el Reglamento (CE) 2073/2005, además del plan de muestreo y la metodología analítica que hay que aplicar, los criterios microbiológicos se asocian a una categoría de alimento concreta y definen el punto o puntos de la cadena alimenticia dónde se aplican, además de las medidas que se tienen que adoptar cuando éstos no se cumplen.⁴¹



El análisis microbiológico del producto final no garantiza, por sí mismo, su seguridad microbiológica, aunque los resultados sean conformes a los criterios microbiológicos legalmente establecidos.

El cumplimiento de los criterios microbiológicos es de utilidad para documentar la validez y la verificación de los procedimientos basados en el APPCC.

El explotador de la empresa alimenticia (el productor de los alimentos listos para el consumo) tiene que tomar las medidas necesarias para cumplir con los criterios microbiológicos establecidos por el Reglamento (CE) 2073/2005, asegurando que los criterios de seguridad alimenticia aplicables a lo largo de la vida útil del alimento (cómo es el caso de *L. monocytogenes*) se respetan en condiciones razonablemente previsibles de distribución,

almacenaje y utilización (artículo 3). Además, si fuera conveniente, está el requisito adicional de investigar el cumplimiento de los criterios de seguridad, mediante la realización de estudios de vida útil.^{41, 67}



Con la entrada en vigor del Reglamento (CE) 2073/2005 se responsabiliza al productor de los alimentos listos para el consumo del cumplimiento de los criterios microbiológicos para el alimento, además de la investigación y justificación científica de su cumplimiento a lo largo de toda la vida útil establecida, en condiciones de conservación y utilización razonablemente previsibles.

El Reglamento (CE) 2073/2005 y sus modificaciones posteriores establecen criterios microbiológicos a partir de una evaluación del riesgo asociado a los microorganismos patógenos relevantes para diferentes categorías de productos. En comparación con los criterios para otros patógenos, los criterios de seguridad alimenticia para *L. monocytogenes* son más complejos y presentan particularidades que merecen que se preste atención.

Los criterios para *L. monocytogenes* se aplican en los alimentos listos para el consumo (véase la definición en el apartado 1.2.1), pero se distinguen tres categorías (Tabla 7) en función de:

- la población a la cual se destina el producto, es decir, el riesgo para el consumidor, y
- las características del producto, es decir, el riesgo asociado al alimento listo para el consumo en relación con el posible crecimiento del patógeno durante la vida útil.

Los productos destinados en una población susceptible (lactantes y personas en situaciones médicas especiales) constituyen la categoría 1.1, para la cual se aplica la «tolerancia cero» que exige la ausencia en 25 gr durante toda la vida útil establecida y en un total de diez muestras por lote.

Para los otros alimentos listos para el consumo, la normativa tolera la presencia de *L. monocytogenes* siempre que la concentración no superen las 100 UFC/gr durante la vida útil establecida, nivel equivalente al objetivo de seguridad alimenticia (FSO) establecido internacionalmente para *L. monocytogenes*.⁹⁵ El Reglamento incorpora cierta flexibilidad y responsabiliza al explotador de la empresa alimenticia de la justificación científica, a satisfacción de la autoridad competente, sobre si los alimentos listos para el consumo que produce pueden favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* y, en caso afirmativo, tiene que demostrar que no se superará el límite máximo permitido durante la vida útil establecida. La normativa prevé la posibilidad de fijar límites intermedios, antes del final de la vida útil, suficientemente bajos para que permitan garantizar que no se superarán las 100 UFC/gr. En caso de que no se puedan demostrar estos requisitos, se aplica la «tolerancia cero» (ausencia

en 25 gr); en este caso, sin embargo, en un total de cinco muestras por lote en la salida de fábrica.

Tabla 7. Criterios microbiológicos de seguridad aplicables en la Unión Europea en relación con *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, según el Reglamento (CE) 2073/2005.⁴¹

Categoría de producto	Plan de muestreo		Límites m M	Método analítico de referencia	Fase en la cual se aplica el criterio
	n	c			
1.1. Alimentos listos para el consumo destinados a lactantes y para usos médicos especiales ¹	10	0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
1. 2. Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a lactantes ni para usos médicos especiales	5	0	100 UFC/g ³	EN/ISO 11290-2 ⁵	Productos comercializados durante su vida útil
	5	0	Ausencia en 25 g ⁴	EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento deje de estar bajo el control inmediato de la empresa alimentaria que lo ha producido
1.3. Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a lactantes ni para usos médicos especiales ^{1,2}	5	0	100 UFC/g	EN/ISO 11290-2 ⁵	Productos comercializados durante su vida útil

Donde: n = número de unidades que componen la muestra; c = número de muestras que dan valores entre m y M (siendo m = M).

¹ En circunstancias normales, no es útil realizar pruebas regulares sobre este criterio para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo:

- los que hayan recibido un tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible después de este tratamiento (p. ej. productos tratados térmicamente en su envase final),
- frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas, excluyendo las semillas germinadas,
- 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, incluyendo productos de cacao y chocolate,
- moluscos bivalvos vivos,
- sal de mesa.

² Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con pH 4,4 o aw 0,92 o con la combinación pH 5,0 y aw 0,94, o los productos con una vida útil inferior a 5 días. También se pueden considerar de esta categoría otros productos, siempre que se justifique científicamente.

³ Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar que el producto no superará el límite de 100 UFC/gr al final de su vida útil. El explotador podrá fijar límites intermedios durante el proceso que tendrían que ser suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 UFC/gr al final de la vida útil.

⁴ Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando éste no pueda demostrar que el producto no superará el límite de 100 UFC/gr.

⁵ Se siembra 1 ml de inóculo en una placa de Petri de 140 mm de diámetro o en tres placas de Petri de 90 mm.

Hay guías para la interpretación de la normativa europea en materia de criterios microbiológicos de los alimentos^{37,67} que muestran esquemas ilustrativos que facilitan la comprensión y la aplicación correctas del Reglamento (véase el árbol de decisiones incluido en el Anexo 3).

Los planes de muestreo establecidos en los criterios microbiológicos están de acuerdo con el riesgo asociado al producto y son más rigurosos ("n" mayores) en alimentos de más riesgo, es decir, destinados a la población de riesgo: lactantes y usos médicos especiales. Las "n" muestras se tienen que tomar del lote de producto analizado, y no de lotes diferentes, y tienen que ser representativas del lote (a partir de un muestreo aleatorio).

Cuando el análisis del producto final se plantea específicamente para evaluar la aceptabilidad de lotes o procesos se tiene que respetar el plan de muestreo especificado como un mínimo, tal como dispone el Reglamento (CE) 2073/2005 (artículo 4).^{41, 58} Eso no excluye la aplicación de muestreos más rigurosos (incrementando "n"), si se considera oportuno.

El artículo 5.3 del Reglamento permite modificar los procedimientos de toma de muestras si se demuestra, a satisfacción de la autoridad competente, que los procedimientos alternativos proporcionan garantías equivalentes o superiores. En este sentido, no es recomendable reducir el número de unidades (n) que se tienen que muestrear, dado que la probabilidad de detectar el patógeno en una sola muestra es baja, particularmente cuando la concentración de éste es baja (ved el funcionamiento de los planes de muestreo en el [Anexo 1](#)). Es aconsejable ajustar la frecuencia de muestreo (p. ex. disminuyendo el número de lotes a verificar), en lugar de aplicar un plan de muestreo menos estricto.^{28, 67}



En la evaluación de la aceptabilidad de lotes o procesos de producción es clave aplicar el plan de muestreo (n, c), tal como lo define el Reglamento (CE) 2073/2005.

No es nada recomendable reducir el número de unidades (n) a analizar, dado que se incrementa notablemente el riesgo de aceptar lotes no conformes (es decir, contaminados).

Además del análisis del producto, el Reglamento (CE) 2073/2005 (artículo 5)⁴¹ exige a los elaboradores de alimentos listos para el consumo que incluyan el muestreo de zonas y equipamientos de producción como una parte del plan de muestreo ambiental, basado en el procedimiento ISO 18593, necesario para garantizar el cumplimiento de los criterios microbiológicos. Sin embargo, ni el Reglamento ni la ISO de referencia proporcionan indicaciones sobre el tipo de superficies (áreas o equipamientos) que se han de muestrear, cuando se tiene que realizar el muestreo, ni las acciones concretas que hay que emprender en caso de detectar *L. monocytogenes* en el control ambiental. Este vacío de información motivó que el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para *L. monocytogenes* elaborara una guía técnica, publicada el 2012.⁹ En el [Anexo 2](#) se recogen los aspectos más relevantes del control de la contaminación ambiental y las recomendaciones para el muestreo de áreas y equipamientos utilizados para la producción de alimentos listos para el consumo.



Entre las medidas de gestión del riesgo de *L. monocytogenes*, el muestreo ambiental es fundamental para detectar nichos y fuentes de contaminación persistentes, y también para verificar el buen funcionamiento de los programas de limpieza y desinfección.

2. Factores determinantes del comportamiento de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo

2.1. Aspectos y factores clave para la categorización de los productos (favorece/no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes*)

2.1.1. Definición de “crecimiento” bacteriano

Generalmente, cuando una bacteria llega en un determinado medio (o alimento), si encuentra las condiciones favorables para su desarrollo, éste se produce en cuatro fases diferenciadas, tal como se describe en el [Anexo 4](#).

Terminológicamente, al hablar del comportamiento bacteriano, es importante diferenciar los fenómenos de *crecimiento*, *inhibición* e *inactivación*.¹⁰⁸

El **crecimiento** bacteriano se produce por multiplicación (división binaria de las células) y se detecta por un incremento medible en la concentración o recuento de la bacteria (expresado generalmente en unidades logarítmicas, es decir, log₁₀ UFC/gr). El parámetro cinético que permite caracterizar cuantitativamente el crecimiento bacteriano es la velocidad específica de crecimiento (μ), que es inversamente proporcional al tiempo de generación (TG).

El crecimiento bacteriano, en términos de incremento en la concentración, se observa después de la fase de latencia (λ). Sin embargo, en determinadas ocasiones (p. ej. una bacteria adaptada a las condiciones ambientales) el crecimiento se puede iniciar inmediatamente, sin necesidad de una fase de adaptación.



Desde la perspectiva de la seguridad alimentaria, como aproximación conservadora (en el peor de los casos), es razonable no considerar la fase de latencia.

La inhibición del crecimiento (o, simplemente inhibición) se produce cuando no se observa un incremento de la población bacteriana, es decir, durante la fase de latencia (*lag* o λ) en la cual la bacteria se intenta adaptar en el medio antes de poder crecer. Los factores inhibidores del crecimiento bacteriano se llaman factores bacteriostáticos o, en el caso de *Listeria*, listeriosstáticos. Generalmente, los inhibidores no tienen por qué producir una inactivación medible.

Analíticamente, el crecimiento bacteriano en los alimentos se mide mediante la determinación y el seguimiento en el tiempo de los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) por unidad de peso o volumen (gr o ml). El procedimiento analítico de muestreo y recuento comporta una variabilidad e imprecisión inherente que, en determinados casos, puede dificultar la interpretación de los resultados, en función del método analítico, el número de muestras y replicados analizados, además de la variabilidad de los resultados obtenidos.

La magnitud de un incremento en el recuento bacteriano puede ser estadísticamente significativa, pero podría no ser relevante desde un punto de vista biológico. Generalmente, se considera que la incertidumbre (*extended uncertainty*) asociada a los procedimientos de determinación de la carga microbiana puede variar entre 0,5 y 1 unidad logarítmica, según si la técnica requiere confirmación de colonias o no.⁵⁷ En el caso concreto de *L. monocytogenes*, en el ámbito americano se considera que el incremento de 1 unidad logarítmica entre dos o más tiempos de muestreo sería el umbral a partir del cual se puede considerar que el crecimiento del patógeno es significativo o relevante.¹²² En cambio, en el ámbito europeo, canadiense y australiano se considera apropiado el criterio de 0,5 unidades logarítmicas,^{43, 70, 85} que equivale al doble de la desviación estándar estimada (es decir, 0,25) asociada al recuento de colonias en placa de *L. monocytogenes*, tal como también recoge el *Codex Alimentarius*.^{28, 29} Análogamente, según el criterio utilizado, la inhibición del crecimiento se daría cuando el incremento del recuento bacteriano fuera inferior a 0,5 o 1 unidad logarítmica.

Estas consideraciones son importantes a la hora de utilizar y evaluar los resultados que proporcionan las diferentes herramientas disponibles para la toma de decisiones sobre si un alimento favorece el crecimiento de *L. monocytogenes* o no (véase el apartado 2.2). Es imprescindible el criterio científico de un microbiólogo experto en microbiología de los alimentos, que tenga en cuenta los datos disponibles (resultados obtenidos y búsqueda bibliográfica complementaria) y la propia experiencia.¹²²

El concepto ***inactivación*** se refiere a la disminución del recuento bacteriano, es decir, a fenómenos de letalidad. Un agente o factor inactivando o letal se llama *bactericida* (o *listericida*, si actúa contra *Listeria*). Desde el punto de vista cinético, el parámetro nombrado valor *D*, o tiempo de reducción decimal, es el tiempo de exposición a un factor letal que es necesario para inactivar (reducir) el 90% (1 unidad logarítmica) la población de un determinado microorganismo. El valor *D* es una medida cuantitativa de la resistencia del microorganismo al factor inactivador, como el calor.

Relacionado con la inactivación, a menudo se utiliza el término ***supervivencia***, para referirse a la capacidad del microorganismo para mantener su viabilidad en unas determinadas condiciones que la comprometen. Generalmente, este concepto se utiliza para describir situaciones en que no se aprecia una disminución rápida o brusca de la concentración bacteriana.

2.1.2. Criterios para la categorización del riesgo asociado los alimentos listos para el consumo

La categorización y clasificación de los alimentos en función del riesgo (*risk ranking*) es un aspecto de interés creciente y cada vez más utilizado en el marco del análisis de riesgos en que actualmente se fundamenta la seguridad alimentaria. Se considera una herramienta para establecer prioridades y asignar los recursos sobre la base de la probabilidad de contaminación del alimento y también según la evolución del patógeno durante el procesamiento, distribución, venta y preparación para el consumo, la exposición (ingesta del alimento) por parte del consumidor y el impacto del patógeno en la salud pública.^{51, 138}

Los alimentos en los que la contaminación por *L. monocytogenes* puede suponer un riesgo para el consumidor son muy diversos y pueden incluir productos cárnicos, productos de la pesca, lácteos, frutas, verduras y la combinación de cualquiera de estos componentes (p. ej. en forma de platos preparados). Según la predicción de casos de listeriosis derivada de la evaluación de riesgos elaborada por la administración de los EUA,⁶⁴ se establecen grupos (*clusters*) o categorías de alimentos listos para el consumo en función del riesgo asociado al consumo de una ración. Estos grupos se resumen en la **Tabla 8**.

Generalmente, entre los factores de riesgo que se asocian a los alimentos implicados en casos y brotes de listeriosis existen los siguientes:^{69, 99}

- El alimento es un producto listo para el consumo (véase la definición en el apartado 1.2.1);
- El alimento es un producto perecedero, que se ha de conservar en refrigeración;
- El alimento es un producto con una vida útil larga (superior a 5 días);
- Hay riesgo de contaminación posprocesamiento (es decir, exposición posletalidad);
- El producto no recibe ningún proceso listericida después de la etapa de exposición posletalidad;
- La formulación y las características del producto permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* a niveles elevados durante la vida útil del producto; y
- El producto puede ser consumido por población de riesgo (embarazadas, ancianos, niños y personas con el sistema inmunitario deprimido).

La concurrencia de más o menos factores de riesgo depende en gran medida del tipo de alimento y sobre todo del tipo de procesamiento que se aplica (véase el apartado 1.2.2). Así, para un mismo tipo de alimento, se puede reducir el riesgo hasta un nivel tolerable e incluso se puede llegar a eliminar si se aplican medidas específicas destinadas a reducir el niveles de *L. monocytogenes* durante la elaboración o procesamiento y/o a limitar o a evitar su crecimiento durante la vida útil del producto. Por lo tanto, en el ámbito operativo, para todos los sectores implicados en la elaboración, distribución, manipulación y venta de los alimentos listos para el

consumo, es interesante conocer el riesgo teniendo en cuenta las particularidades de cada producto y proceso productivo en cuestión.

Tabla 8. Categorías de alimentos listos para el consumo en función del riesgo relativo de contraer listeriosis por el consumo de una ración.⁶⁴

Categoría	Alimentos incluidos en la categoría	
1 Riesgo muy alto a riesgo alto	CÁRNICOS	<ul style="list-style-type: none"> · Productos cárnicos cocidos (<i>deli meats</i> tipo jamón cocido, fiambres, mortadela, <i>Bologna sausage</i>, etc.) manipulados después del tratamiento de pasteurización (p. ex. loncheados y envasados) · Salchichas tipo Frankfurt consumidas sin calentar · Paté y otros productos cárnicos para untar
	PRODUCTOS DE LA PESCA	<ul style="list-style-type: none"> · Pescado ahumado
	LÁCTEOS	<ul style="list-style-type: none"> · Leche cruda (sin pasteurizar)
2 Riesgo alto a riesgo moderado	PRODUCTOS DE LA PESCA	<ul style="list-style-type: none"> · Crustáceos cocidos
	LÁCTEOS	<ul style="list-style-type: none"> · Productos lácteos con contenido graso alto y otros (mantequilla, crema de leche, etc.) · Leche pasteurizada · Queso fresco no madurado (> 50% humedad: mató, recuit, requesón, <i>cottage cheese</i>, <i>ricotta</i>, etc.)
3 Riesgo moderado a riesgo bajo	VEGETALES	<ul style="list-style-type: none"> · Platos preparados de tipo ensaladas condimentadas (p. ex. fruta y/o verdura con pasta, productos cárnicos, productos de la pesca y/o huevo sazonados) · Frutas (preparadas como producto listo para el consumo, p. ex. cortadas y envasadas) · Vegetales crudos (en forma de producto listo para el consumo, p. ex. limpios, cortados y envasados).
	CÁRNICOS	<ul style="list-style-type: none"> · Embutidos fermentados · Salchichas tipo Frankfurt consumidas después de calentar
	PRODUCTOS DE LA PESCA	<ul style="list-style-type: none"> · Conservas de pescado marinado, en vinagre, desecado · Productos de la pesca crudos (p. ex. moluscos)
	LÁCTEOS	<ul style="list-style-type: none"> · Queso fresco cremoso · Queso blando madurado (> 50% humedad: brie, camembert, feta, etc.) · Queso semiblando (39%-50% humedad: queso azul, etc.)
4 Riesgo bajo a riesgo muy bajo	LÁCTEOS	<ul style="list-style-type: none"> · Leche fermentada (yogurt, crema ácida, <i>buttermilk</i>) · Helados y productos lácteos congelados · Queso procesado (queso fundido, para untar, etc.) · Queso duro y curado (< 39% humedad: parmesano, <i>cheddar</i>)

^a: categorización obtenida con el análisis de agrupamientos de los resultados de la evaluación cuantitativa del riesgo relativo para la salud pública asociado a la presencia de *L. monocytogenes* en determinados tipos de alimentos listos para el consumo, elaborada por la administración norteamericana americana.⁶⁴

La caracterización del producto en relación con los factores intrínsecos y extrínsecos que afectan al comportamiento de los microorganismos en los alimentos, más allá de las especificaciones técnicas y de los procesos productivos, es un aspecto clave y esencial para caracterizar el riesgo asociado a un alimento listo para el consumo y así lo establece el Reglamento (CE) 2073/2005 (anexo II).⁴¹ Desgraciadamente, no siempre se le da la importancia que se merece y, como consecuencia, este vacío de información dificulta el proceso de

categorización y limita el uso correcto de las herramientas para la evaluación, determinación y validación de la vida útil segura de los alimentos.

Por tanto, para entender y estimar como se comportará *L. monocytogenes* en un alimento listo para el consumo, los elaboradores tienen que conocer con detalle sus propiedades fisicoquímicas y químicas relevantes (valores de pH, a_w , concentración de sal y conservantes, contenido acuoso, microbiota asociada, etc.), además de las condiciones de conservación razonablemente previsibles (envase, composición de la atmósfera, temperatura de conservación, etc.).

Para predecir el efecto de alguno de estos factores en el comportamiento de *L. monocytogenes*, y de los microorganismos en general, hace falta tener en cuenta cómo actúa el factor frente al microorganismo.¹³⁴ Por ejemplo, en el caso de la sal (cloruro sódico), sería la concentración en fase acuosa, que al mismo tiempo permitiría estimar la equivalencia en términos de a_w .^{44, 131}

A la hora de caracterizar y categorizar los alimentos listos para el consumo, los valores medios globales de las propiedades de un determinado producto no proporcionan información suficiente. La caracterización del producto (incluyendo las condiciones de conservación asociadas) tendría que considerar el estudio de la variabilidad que se puede dar en un mismo lote y también entre lotes de producción.⁴¹ Esta variabilidad es esencial para conocer y evaluar diferentes escenarios, especialmente del tipo «en el peor de los casos», y para aplicar márgenes de seguridad bastante conservadores⁶⁸ en la determinación de si el producto se clasifica automáticamente como alimento que no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes*, pero también en la realización de los estudios de vida útil y evaluación de la seguridad del producto en cuestión. El conocimiento de la distribución de valores posibles de las diferentes características del producto también constituye la base para establecer límites críticos, justificar tolerancias y, por lo tanto, controlar y vigilar los factores que, dentro del sistema APPCC, se consideren críticos para prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes*.



Es necesario caracterizar los productos listos para el consumo (determinar valores de pH, a_w , concentración de sal, concentración de conservantes, contenido acuoso, etc.) y condiciones de conservación (tipo y atmósfera de envasado, temperatura, etc.).

Esta caracterización tendría que considerar el estudio de la variabilidad dentro de y entre lotes de producción. Hay que conocer los diferentes escenarios, especialmente «en el peor de los casos».

La caracterización puede ser más difícil en el caso de los alimentos compuestos o que incluyen diversos ingredientes (p. ej. ensaladas, pizzas, lasaña, etc.). Cada ingrediente o componente tiene características diferentes y, probablemente, cambian en el tiempo, por ejemplo a causa

de la redistribución de la humedad o de la migración de ácidos y otros conservantes de un componente a otro, hasta establecerse el equilibrio. Hay que caracterizar las diferentes partes o fases que componen el producto una vez elaborada y a lo largo de su vida útil, y determinar cuáles son las que presentan un mayor riesgo (p. ej., las que presentan valores de pH y a_w más altos). El análisis de los componentes por separado (antes de elaborar el producto) o la homogeneización de los diferentes componentes y el análisis posterior no proporciona información representativa y puede infravalorar notablemente el riesgo del producto.³⁸ La combinación de componentes puede crear condiciones más favorables para el crecimiento en comparación con las de cada componente por separado. A modo de ejemplo, si un producto con a_w baja y pH poco ácido entra en contacto con otro con a_w alta y pH ácido (p. ej. bocadillos con queso o rebanadas de tomate) puede permitir la neutralización de la acidez e incrementar el a_w , especialmente en la interfase entre ambos componentes.¹³⁸

En la [Tabla 9](#) se presenta una valoración del riesgo de los diferentes tipos de productos en función de la concurrencia de los factores de riesgo de contaminación y/o crecimiento de *L. monocytogenes* asociados a los procesos productivos y a las características de los alimentos. La tabla, basada en la publicada en el *Manual de seguretat alimentària del sector carni porcí: com gestionar els principals perills* (INNOVACC),^{15a} pretende ser una muestra representativa de las diferentes combinaciones posibles; así mismo, se podrían plantear otras combinaciones que no se incluyen explícitamente.

Tabla 9. Valoración del riesgo asociados a los alimentos listos para el consumo en función de la concurrencia de los factores de riesgo asociados a la contaminación y/o crecimiento de *L. monocytogenes*. Adaptado de *Manual de seguretat alimentària del sector carni porci: com gestionar els principals perills* (INNOVACC).^{15a}

Tipos de producto	¿Es probable la contaminación de la materia prima?	Procesado: etapa de letalidad (impacto sobre el riesgo)?	Producto final con características bacteriológicas (enhecesas o embriecadas)?	¿Se manipula después de la etapa de letalidad? (probabilidad de recontaminación)	Tratamiento letalidad (impacto sobre el riesgo)?	RIESGO	Ejemplo/Comentario
Vegetales crudos	Si	Limpieza y desinfección (reducir)	No	Si	No Si (elimina)	ALTO DESPRECIABLE	Frutas, verduras, semillas germinadas (patatas, cereales...) Smoothie de frutas y verduras trituradas por altas presiones
Carnes y productos de la pesca crudos (ahumados y marinados)	Si	Ahumado y/o marinado (reducir)	No Si	Si	No No	ALTO MODERADO O BAJO	Salmon ahumado Salmon ahumado formulado con lactato/diacetato
Carnes y productos de la pesca cocidos	Si	Pasteurización y/o esterilización (elimina)	No Si	Si	No aplica No aplica Si (elimina)	DESPRECIABLE ALTO BAJO-DESPRECIABLE	Jamón cocido en lata sin manguabación posterior a la etapa de letalidad Gambas (pre-cocidas) Jamón cocido pasteurizado con altas presiones
				No	No aplica	MODERADO O BAJO	Jamón cocido formulado con lactato/diacetato
			Si	Si	Si	MODERADO O BAJO-DESPRECIABLE	Jamón cocido con lactato y diacetato pasteurizado con altas presiones

^{15a}: Los niveles de contaminación iniciales razonablemente previsible son relevantes para determinar el criterio de funcionamiento exigible a la etapa de posletalidad.
^b: La eliminación del riesgo se considera a partir de la consecución de criterios de funcionamiento (es decir, reducciones en la carga del patógeno) de la orden de 5 a 6 unidades logarítmicas, según el tipo de producto. Hay que evaluar si magnitudes de reducción inferiores son compatibles con los estándares de seguridad exigibles (p. ej. tolerancia cero - ausencia en 25 gr, en n = 5 o n = 10 unidades del lote)
^c: Características fisicoquímicas, de formulación (p. ej. ácidos orgánicos) y/o envasado.
^d: Asumiendo que el producto final tiene características físico-químicas (pH y/o aw) que lo hacen bacteriostático, es decir, no permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil establecida.

Tabla 9 (continuación). Valoración del riesgo asociados a los alimentos listos para el consumo en función de la concurrencia de los factores de riesgo asociados a la contaminación y/o crecimiento de *L. monocytogenes*. Adaptado del *Manual de seguretat alimentària del sector carni porcí: com gestionar els principals perills* (INNOVACC).^{15a}

Tipos de producto	¿Es probable la contaminación de la materia prima? ^a	Procesado: etapa de letalidad (impacto sobre el riesgo) ^b	Producto final con características bacteriológicas (intrínsecas o extrínsecas) ^c	¿Se manipula después de la etapa de letalidad? (probabilidad de recontaminación)	Tratamiento letalidad (impacto sobre el riesgo) ^d	RIESGO	Ejemplo/Comentario	
Productos cárnicos crudos-curados, picadas y fermentados con o sin manipulación postprocesado	Sí	Fermentación poco acidificante (reduce < 1log)	Sí	No/Sí	No Sí (reduce) Sí (elimina)	MODERADO BAJO DESPRECIABLE	El uso de cultivos bioprotectores antiflisteria reduce notablemente el riesgo	
		Fermentación acidificante (reduce > 1log)	Sí	No/Sí	No Sí (reduce) Sí (elimina)	BAJO MUY BAJO DESPRECIABLE		
	Sí	Salado, maduración, secado (reduce)	No (dudoso)	No/Sí	No Sí (reduce) Sí (elimina)	BAJO-MUY BAJO MUY BAJO DESPRECIABLE		Jamón curado Jamón curado tratado con altas presiones
					No Sí (reduce) Sí (elimina)	MODERADO-BAJO BAJO-MUY BAJO DESPRECIABLE		Jamón curado con a_w elevada Jamón curado con a_w elevada tratado con altas presiones

^a: Los niveles de contaminación iniciales razonablemente previsible son relevantes para determinar el criterio de funcionamiento exigible a la etapa de posletalidad.

^b: La eliminación del riesgo se considera a partir de la consecución de criterios de funcionamiento (es decir, reducciones en la carga del patógeno) de la orden de 5 a 6 unidades logarítmicas, según el tipo de producto. Hay que evaluar si magnitudes de reducción inferiores son compatibles con los estándares de seguridad exigibles (p. ej. tolerancia cero - ausencia en 25 gr, en $n = 5$ o $n = 10$ unidades del lote)

^c: Características fisicoquímicas, de formulación (p. ej. ácidos orgánicos) y/o envasado.

^d: Asumiendo que el producto final tiene características físico-químicas (pH y/o aw) que lo hacen bacteriostático, es decir, no permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil establecida.

Taula 10. (continuació) Valoració del risc associat als aliments llestos per al consum en funció de la concurrència dels factors de risc associats a la contaminació i/o creixement de *L. monocytogenes*. Adaptat del Manual de seguretat alimentària del sector carni porcí: com gestionar els principals perills (INNOVACC)^{1,5a}.

Tipus de producte	¿Es probable la contaminación de la materia prima? ¹	Procesado: etapa de letalidad (impacto sobre el riesgo) ²	Producto final con características bacteriológicas (intrínsecas o extrínsecas) ³	¿Se manipula después de la etapa de letalidad? (probabilidad de recontaminación)	Tratamiento listericida posletalidad (impacto sobre el riesgo) ⁴	RIESGO	Ejemplo/Comentario
Lácteos		Fermentación, maduración (reduce)	No	No/Sí	No	MODERADO	Quesos elaborados con leche cruda o termizada
		Pasteurización (elimina) y fermentación (reduce)	Sí	No/Sí	No	MUY BAJO-DESPRECIABLE	yogur elaborado con leche pasteurizada
		Pasteurización (elimina) y acidificación (reduce)	No	Sí	No	ALTO	Queso fresco, mozzarella
		Pasteurización (elimina) y fermentación-maduración (variable)	No	Sí	Sí (elimina)	DESPRECIABLE	Queso fresco pasteurizado en envase
		Pasteurización (elimina) y fermentación-maduración (reduce)	Sí	Sí	No	ALTO	Queso de pasta blanda (elevado contenido acuoso)
		Pasteurización (elimina) y fermentación-maduración (variable)	Sí ⁴	No/Sí	No	BAJO	Queso de pasta blanda con nisha y/o cultivo bioprotectores ⁵

¹: Los niveles de contaminación iniciales razonablemente previsible son relevantes para determinar el criterio de funcionamiento exigible a la etapa de posletalidad.

²: La eliminación del riesgo se considera a partir de la consecución de criterios de funcionamiento (es decir, reducciones en la carga del patógeno) de la orden de 5 a 6 unidades logarítmicas, según el tipo de producto. Hay que evaluar si magnitudes de reducción inferiores son compatibles con los estándares de seguridad exigibles (p. ej. tolerancia cero - ausencia en 25 gr, en n = 5 o n = 10 unidades del lote)

³: Características fisicoquímicas, de formulación (p. ej. ácidos orgánicos) y/o envasado.

⁴: Asumiendo que el producto final tiene características físico-químicas (pH y/o aw) que lo hacen bacteriostático, es decir, no permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil establecida.

2.1.3. *Vida útil comercial respecto a vida útil segura*

La *vida útil* de los alimentos se define como el período durante el cual el alimento es deseable para el consumo¹⁷ en función de criterios de aceptabilidad que incluyen, básicamente:³³

- a) el mantenimiento de las propiedades sensoriales (en la llamada *vida útil comercial*), que se pueden alterar por reacciones fisicoquímicas, bioquímicas o bien por la acción de microorganismos alteradores;
- b) el cumplimiento de las declaraciones nutricionales del producto;
- c) la garantía de la inocuidad del producto (*vida útil segura*), el cual no ha de tener la presencia de un o más peligros (p. ex. microorganismo patógeno y/o toxina) a niveles inaceptables que supongan un riesgo por la salud del consumidor.

Según el Reglamento (CE) 2073/2005,⁴¹ *vida útil es el período anterior a la fecha de duración mínima o la fecha de caducidad según la Directiva 2000/13/CE, actualmente substituida por el Reglamento (UE) 1169/2011.¹⁴⁵ En este reglamento europeo, la *fecha de duración mínima* de un alimento es una de las indicaciones obligatorias en el etiquetado de los alimentos y se define como *la fecha hasta la cual el alimento conserva sus propiedades específicas cuando se almacena correctamente*. En el caso de alimentos microbiológicamente muy perecederos y que, por eso, puedan comportar un peligro inmediato para la salud del consumidor, después de un periodo corto, la fecha de duración mínima se tiene que cambiar por fecha de caducidad y su indicación se tiene que completar con la descripción de las condiciones de conservación y/o uso. Después de la fecha de caducidad, el alimento no se considera seguro. Así pues, la fecha de caducidad equivale a la vida útil segura de los alimentos.¹⁴⁵*

Idealmente, la vida útil segura de los alimentos tendría que ser más larga que la vida útil comercial. De esta manera, la seguridad del producto continuará siendo aceptable al final de su vida útil, cuando aparezcan los signos de alteración y, en principio, el consumidor rechace el consumo. Sin embargo, en determinadas circunstancias, las características del producto, del procesamiento y/o condiciones de conservación pueden tener efectos inhibidores del crecimiento de microorganismos responsables de la alteración, pero esta acción puede ser menos eficaz o incluso nula contra el patógeno o patógenos relevantes. En estos casos, la vida útil segura se acercaría, o incluso podría ser inferior, a la vida útil comercial, lo cual representaría un riesgo mayor para el consumidor.⁴⁵

La determinación de la vida útil segura de los alimentos perecederos, como por ejemplo muchos productos listos para el consumo, es una responsabilidad y obligación de los elaboradores y forma parte de las medidas de control para garantizar el cumplimiento de los criterios microbiológicos de seguridad alimenticia en relación con *L. monocytogenes*.⁴¹ Como medida de control, la vida útil se tiene que validar como aparte del sistema de gestión de riesgos (es decir, el APPCC) y especialmente en los casos en que no haya ningún estudio de vida útil para el producto en cuestión, se elabore un nuevo producto, se modifique un

producto ya existente o se cambie el lugar o equipamiento de producción.⁶⁶ En el [Anexo 5](#) se describe brevemente como se deben abordar los estudios de vida útil segura de los alimentos.



El productor de alimentos listos para el consumo tiene la obligación y la responsabilidad de determinar la vida útil (segura) de los productos que comercializa. Esta es una medida de control, que se tiene que validar, para garantizar el cumplimiento de los criterios microbiológicos en relación con *L. monocytogenes*.

En principio, los explotadores de las empresas alimenticias tienen que desarrollar sus propios procedimientos y protocolos para determinar y documentar científicamente la condición, la categoría y la vida útil de los productos listos para el consumo que elaboran. Sin embargo, las empresas no siempre disponen de los recursos y la formación suficientes y necesitan la colaboración de otras empresas, laboratorios de análisis o centros de investigación con la capacidad y experiencia acreditadas para evaluar la vida útil de los alimentos, realizar búsquedas bibliográficas, seleccionar y aplicar adecuadamente modelos predictivos y/o diseñar, ejecutar e interpretar los ensayos de laboratorio.^{59, 122} Es importante ser cautelosos en la aplicación de los diferentes útiles y sobretodo en la interpretación de los resultados. Convendría consultar una entidad competente y con experiencia en la realización de estudios de vida útil.⁴



Para llevar a cabo estudios de vida útil, desde el planteamiento y diseño del estudio a la ejecución, evaluación e interpretación de los resultados, hacen falta conocimientos y experiencia acreditada en el uso y aplicación de los recursos y las herramientas necesarias (p. ej. búsqueda de bibliografía científica, diseño y realización de ensayos de laboratorio; desarrollo, validación y aplicación de modelos predictivos, etc.).

2.2. Herramientas para la categorización «favorece/no favorece» el crecimiento de *L. monocytogenes*

Uno de los principales factores de riesgo de los alimentos listos para el consumo en relación con *L. monocytogenes* es que las características del producto y las condiciones de conservación permitan el crecimiento del patógeno (ved el apartado 2.1.2). Según los resultados de

evaluaciones del riesgo expresados en base al consumo de una ración de determinados tipos de alimentos listos para el consumo, el riesgo de contraer listeriosis es entre 100 y 1000 superior en los productos que favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*.^{73, 96} Precisamente, el Reglamento (CE) 2073/2005 establece dos categorías de productos listos para el consumo (no destinados a lactantes ni para usos médicos especiales) en función de si pueden favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* o no (véase el apartado 1.3.2). Se considera que un alimento no puede favorecer el crecimiento del patógeno si presenta:^{28, 41}

- un pH ≤ 4 , independientemente del valor de a_w ,
- una $a_w \leq 0,92$, independientemente del valor de pH
- una combinación de pH $\leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$.

Es posible que productos que no cumplan estas especificaciones también se puedan incluir en esta categoría si se justifica científicamente a partir de la información obtenida en la caracterización del producto (apartado 2.1.2), mediante procedimientos basados en la consulta de la literatura científica y el histórico de datos (apartado 2.2.1), la aplicación de modelos predictivos (apartados 2.2.2 y 2.3.1) y/o la realización de pruebas de inoculación específicas (apartados 2.2.3 y 2.3.2).^{24, 41}

2.2.1. Consulta de la bibliografía científica y del histórico de datos

La literatura científica incluye los libros, los artículos científicos y las revisiones hechas por expertos que se publican en revistas especializadas (preferiblemente incluidas en el Journal Citation Reports), los informes de organismos oficiales, etc., que proporcionan información sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* en determinadas condiciones equivalentes a las del producto y las condiciones de conservación que se han caracterizado.

En este punto, la consulta de bases de datos en relación con la supervivencia y crecimiento de microorganismos (en concreto, *L. monocytogenes*) es interesante y útil, a más de facilitar enormemente la tarea de búsqueda. Éste es el caso de la base de datos disponible en el portal ComBase (*ComBase Browser*, www.combase.cc),¹⁶ que actualmente contiene más de 8.000 registros de experimentos sobre el comportamiento de *Listeria* (*L. innocua* y *L. monocytogenes*) en diferentes matrices (medio de cultivo y diversos alimentos). En la [Figura 4](#) se muestra la captura de pantalla de uno de los registros incluidos en el sistema, concretamente sobre la evolución de *L. monocytogenes* inoculado en jamón cocido loncheado (pH = 6,3; $a_w = 0,98$) durante la conservación a 6 °C. El sistema muestra información relevante en relación con el experimento registrado (condiciones, cepas y otros detalles), además de los datos de recuentos obtenidos a lo largo del experimento, en forma de gráfico y tabla.

Complementariamente, el productor puede recurrir a los resultados recopilados a lo largo del tiempo (es decir, el histórico de datos) en relación con las verificaciones y análisis microbiológicos del producto acabado (listo para su comercialización), y también al final de su vida útil.⁶⁷

En relación con el histórico de datos, se pueden realizar los llamados ensayos de durabilidad, es decir, experimentos para determinar el comportamiento de *L. monocytogenes* presente de forma natural en un lote de producto (identificado como contaminado en los controles ordinarios) y sometido a determinadas condiciones de conservación (p. ej. perfil de tiempo y temperatura razonablemente previsible).⁴³ Sin embargo, los resultados de este tipo de ensayos son difíciles de interpretar por la baja probabilidad de analizar las unidades del lote efectivamente contaminadas, a causa de la concentración generalmente baja y la distribución heterogénea de las contaminaciones por *L. monocytogenes* inicialmente presente.^{4, 24, 59, 67}

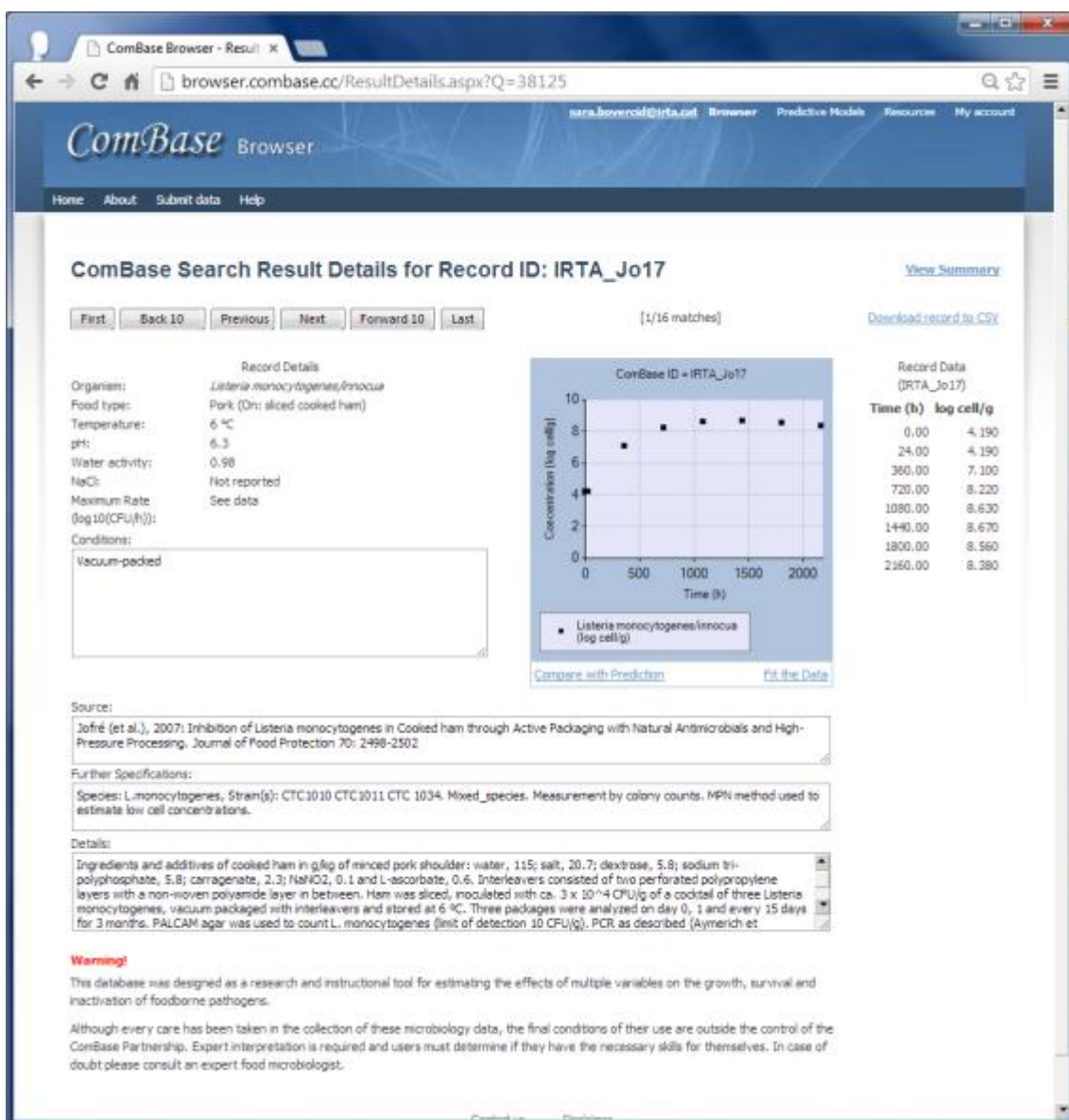


Figura 4. Captura de pantalla de la base de datos *ComBase Browser*, que muestra uno de los registros disponibles sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* en alimentos.

2.2.2. Modelos predictivos de crecimiento/no crecimiento (G/NG)

Los modelos predictivos, en el marco de la microbiología predictiva o ecología microbiana cuantitativa, son funciones matemáticas que describen cuantitativamente la respuesta de los microorganismos en función de las condiciones ambientales que los afectan. Debidamente validados para el alimento en cuestión, estos modelos matemáticos se pueden utilizar con finalidades predictivas para simular el comportamiento del patógeno en condiciones no ensayadas experimentalmente.²¹ La microbiología predictiva es una disciplina emergente y en los últimos años se ha incrementado notablemente el número y la validez de los modelos predictivos disponibles, y también ha aumentado la aceptación y aplicación de estos modelos por parte de la industria, organismos internacionales y las autoridades competentes.^{21, 29, 31, 32, 41, 156} De hecho, su uso se considera un procedimiento válido por estudiar el cumplimiento de los criterios microbiológicos del Reglamento (CE) 2073/2005 (anexo II).⁴¹

Los modelos predictivos son muy útiles en la toma de decisiones en el marco de la gestión de la seguridad microbiológica de los alimentos. El éxito de su uso dependerá de si la elección del modelo es adecuada al objetivo de la simulación, a las características del producto y a las condiciones razonablemente previsibles. Al mismo tiempo es fundamental disponer de datos representativos de los factores intrínsecos y extrínsecos, incluyendo la variabilidad entre diferentes lotes y dentro del mismo lote,¹³⁵ que será la información de entrada (input) a partir de la cual se hará la predicción (output). Sin embargo, también es importante reconocer las limitaciones de los modelos predictivos: se trata de simplificaciones de la realidad y, por eso, requieren de usuarios formados y experimentados en la aplicación de estas herramientas, a más de tener en cuenta otros aspectos y factores de la ecología microbiana que no estén incluidos en el modelo.¹³³

Entre los diferentes tipos de modelos predictivos, los de tipo probabilístico sobre límites de crecimiento (*growth boundaries*) o interfase entre crecimiento/no crecimiento (G/NG, del inglés *growth/no-growth*), permiten amar|estimar la probabilidad de que un microorganismo crezca en función de unos o más factores ambientales.¹³⁴ Estos modelos permiten identificar la combinación de factores que permite el crecimiento con un nivel de probabilidad determinado. Se considera que una probabilidad del 0,1 (es decir, un 10%) indica que hay condiciones inhibitorias; una probabilidad del 0,5 (un 50%) se sitúa en la frontera (límite o *boundary*) entre G/NG y una probabilidad del 0,9 (un 90%) significa que hay una alta probabilidad de crecimiento; sin embargo, estos límites de corte pueden variar según el trabajo.¹⁰⁰ En este sentido, los modelos sobre límites de crecimiento microbiano son una herramienta valiosa para cuantificar los efectos de la combinación de factores (la tecnología de barreras) y diseñar productos mínimamente procesados.^{114,128} Estos modelos son especialmente interesantes para estimar los límites de crecimiento de determinados factores que, presentes aisladamente, no inhiben el crecimiento, pero sí que lo pueden hacer cuando se presentan en combinación con otros factores barrera.¹²⁸

En la literatura científica son numerosos los trabajos que presentan y/o revisan modelos predictivos del tipo G/NG para *L. monocytogenes* en diferentes tipos de matrices.^{11, 50, 106, 115, 134, 141, 153, 159} Los modelos se diferencian en el número y el intervalo de valores de los factores ambientales (generalmente la temperatura, el pH, la a_w y/o las sustancias con actividad listeriostática), así como en el criterio usado para diferenciar el crecimiento de la inhibición (p. ej. 0,5 o 1 unidad logarítmica de incremento de la concentración del patógeno en el período del experimento).

Como ilustración, en la Figura 5 se presenta un ejemplo relacionado con la evaluación de la capacidad de los productos cárnicos cocidos listos para el consumo para favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* en función del pH, la a_w y la temperatura de conservación.¹⁰⁵ En cuanto a la combinación de pH y a_w se añade un factor de conservación adicional (p. ej. la temperatura de refrigeración, incluida en el modelo G/NG de Koutsoumanis y Sofos¹⁰⁷), la línea que separa las condiciones de crecimiento y no crecimiento se desplaza hacia la derecha. Como consecuencia, se amplía la zona de combinación de pH y a_w en la cual no se favorece el crecimiento de *L. monocytogenes*. De esta manera se incrementa la proporción de productos que entrarían en esta categoría (puntos marcados con color verde en la Figura 5).

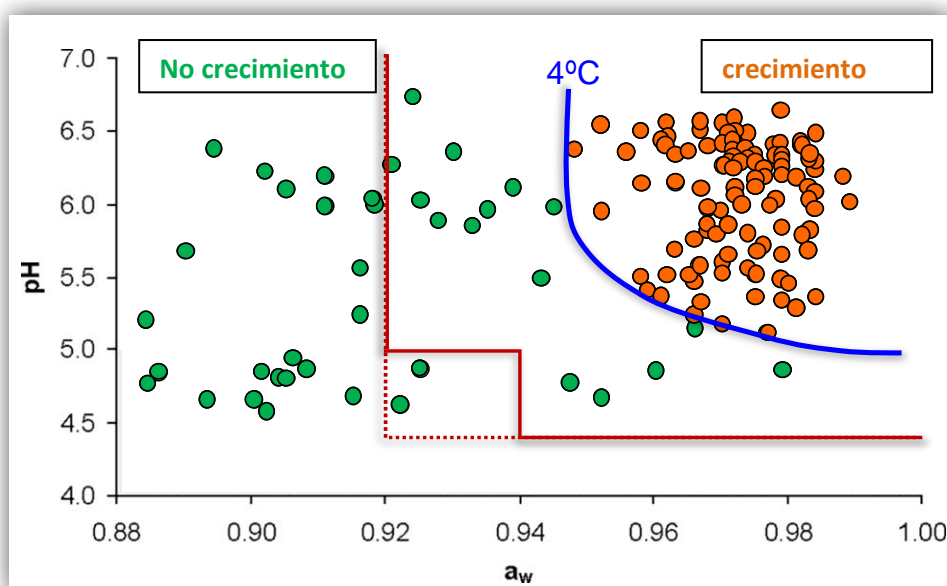


Figura 5. Distribución de valores de pH y a_w observados (●, ●) en productos cárnicos cocidos en lonchas y envasados en atmosfera modificada o al vacío (listos para el consumo).¹⁰⁵ Las líneas representan los límites que separan las zonas de crecimiento y no crecimiento de *L. monocytogenes* según: los valores mínimos de pH (4,4) o a_w (0,92) de crecimiento;⁹⁴ — la combinación de pH y a_w prevista en el Reglamento (CE) 2073/2005;⁴¹ y — el límite de crecimiento al 50% de probabilidad en función del pH y a_w a una temperatura de 4 °C según el modelo de Koutsoumanis y Sofos.¹⁰⁷

A pesar de los numerosos modelos de tipos G/NG disponibles en la literatura y usados frecuentemente en los trabajos científicos, la aplicación de estas herramientas en el ámbito operativo (producción de alimentos) se limita generalmente al uso de sistemas informáticos fáciles de usar y mayoritariamente de acceso libre. Con estos sistemas, el usuario introduce el valor de los factores (input) y la aplicación devuelve el valor de probabilidad de crecimiento del microorganismo considerado. Sin embargo, actualmente hay pocas aplicaciones disponibles que incorporen modelos probabilísticos sobre límites de crecimiento de *L. monocytogenes*, y entre éstas destacan las que se describen a continuación.

Shelf Stability Predictor

El sistema *Shelf Stability Predictor*, desarrollado por el *Center for Meat Process Validation* de la Universidad de Wisconsin (disponible a http://www.meathaccp.wisc.edu/ST_calc.html),³⁶ incorpora un model G/NG elaborado específicamente en y para productos cárnicos listos para el consumo, envasados al vacío con un amplio intervalo de pH (4,6 a 6,5) y a_w (0,47 a 0,98) (Figura 6). El modelo permite evaluar la autoestabilidad de los productos mediante la estimación de la probabilidad de crecimiento de *L. monocytogenes*, durante cinco semanas de conservación a 21 °C.¹⁰⁰ En este sistema, las predicciones del orden de 0 a 0,2 se interpretan como que el crecimiento del patógeno es improbable, mientras que valores de 0,8 a 1,0 significan que es altamente probable que el producto favorezca el crecimiento de *L. monocytogenes*. Con resultados entre 0,21 y 0,79 (es decir, una probabilidad que *L. monocytogenes* pueda crecer entre el 21% y el 79%) se recomienda llevar a cabo pruebas de laboratorio específicas para determinar el potencial de crecimiento del patógeno en el producto concreto (véase el apartado 2.2.3).

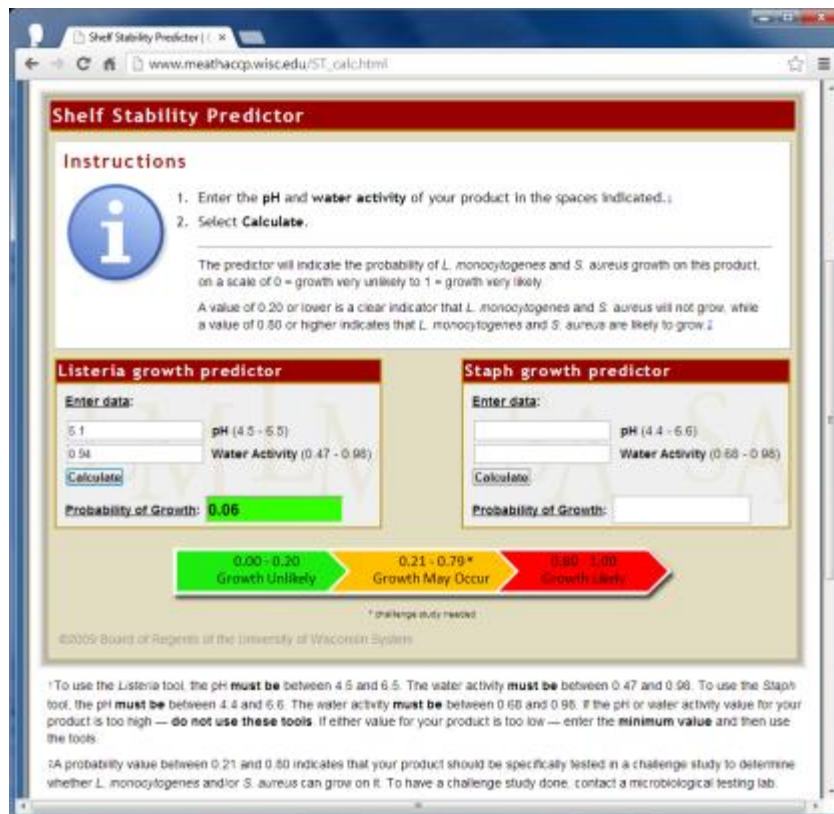


Figura 6. Captura de pantalla del sistema *Shelf Stability Predictor*

Sym'Previus – Growth interfases module

El sistema *Sym'Previus*¹ consisteix en una col·lecció de eines en línia, basades en la microbiologia predictiva, per ajudar a la presa de decisions en la gestió de la seguretat i qualitat microbiològica dels aliments. Al sistema, desenvolupat per una xarxa d'entitats franceses, s'accedeix per subscripció. Entre les aplicacions disponibles està el mòdul *Growth interfases* (interfase de creixement), que permet simular l'influència del pH, a_w , temperatura i concentració d'àcid làctic en la probabilitat de creixement de diferents microorganismes, incloent *L. monocytogenes*. El sistema proporciona gràfics de isoprobabilitat de creixement (10%, 50% i 90%). S'introdueixen els valors específics dels factors característics del producte estudiat, es situen a la gràfica i es comprova visualment si es troben a la zona de creixement o en la de no-creixement. En la [Figura 7](#) es mostra una captura de pantalla de la simulació obtinguda per productes amb diferents pH i a_w , emmagatzegats a 8 °C. Segons les prediccions del model, les combinacions de valors de pH i a_w superiors als descrits en el Reglament 2073/2005 (p. ex. pH = 5,8 i a_w = 0,93, del producte C en la [Figura 7](#)) no permetrien el creixement de *L. monocytogenes*.

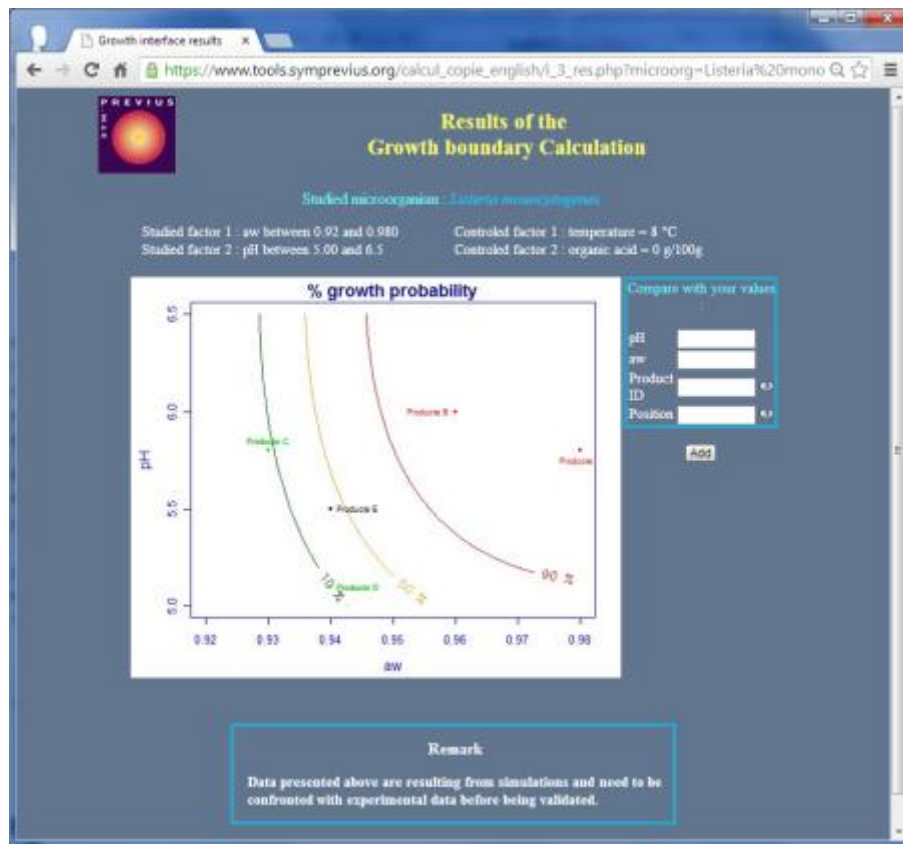


Figura 7. Captura de pantalla de la aplicación interfase de crecimiento (*Growth interfaces*) para *L. monocytogenes* disponible en el portal *Sym'Previus*.

Microbial Response Viewer

El *Microbial Response Viewer* (MRV) es una base de datos, accesible desde <http://mrv.nfri.affrc.go.jp>¹⁰³ y desarrollada en Japón a partir de la modelización de los datos de G/NG, crecimiento e inactivación de más de 35.000 registros disponibles en el *ComBase* (véase el apartado 2.2.1) en función del pH (4,0-8,7), a_w (0,240-0,999) y temperatura (0 °C-37 °C).¹⁰⁴ El sistema proporciona información sobre condiciones límite de G/NG, además de la tasa de crecimiento asociada a un tipo de microorganismo (p. ej. *L. monocytogenes*) y matriz (medio de cultivo, productos cárnicos, productos de la pesca, productos lácteos, vegetales). Además, permite que el usuario visualice los gráficos de contorno (*contour plots*) bidimensionales de dos de los tres factores considerados, mientras que el tercero se mantiene constante en el valor especificado. Es interesante el hecho de que el sistema superpone los datos originales del *ComBase*, de manera que permite comparar las predicciones con las observaciones experimentales para diferentes combinaciones de condiciones (Figura 8).

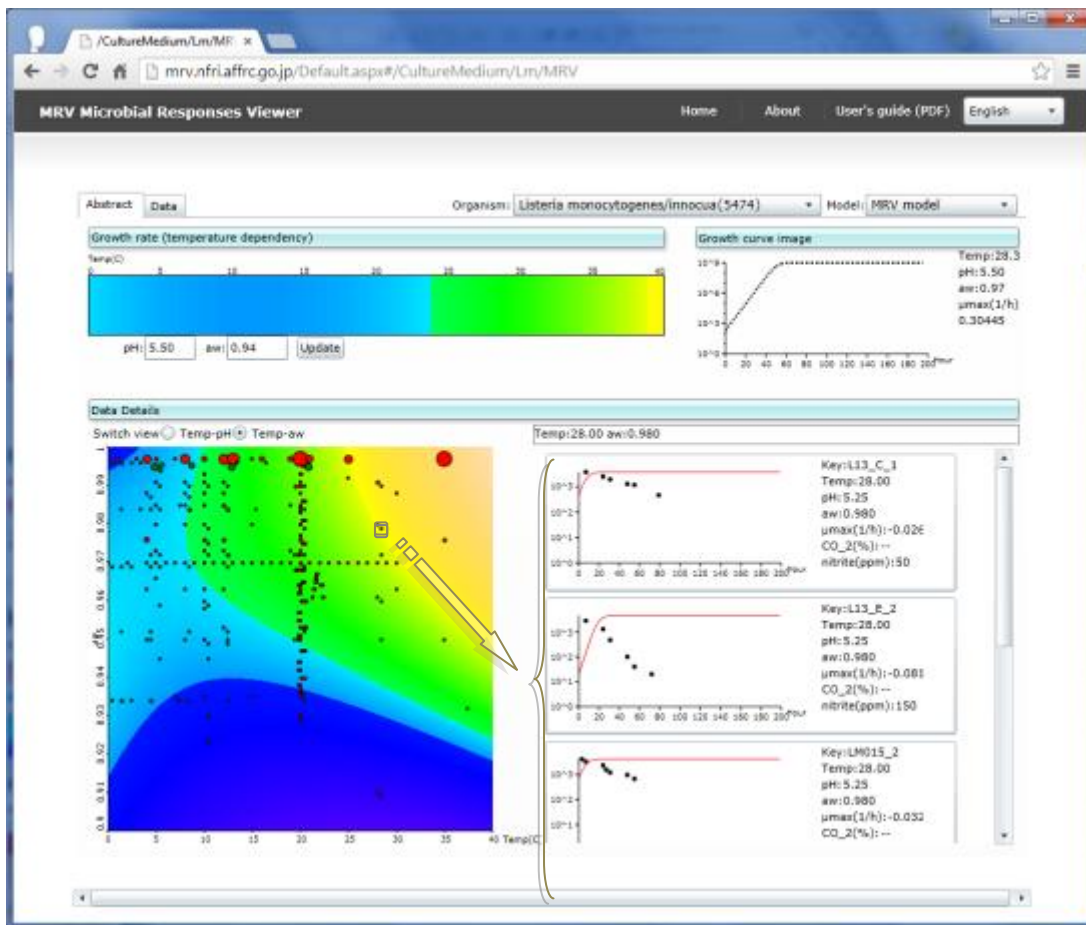


Figura 8. Captura de pantalla del *Microbial Response Viewer*.

Seafood Spoilage and Safety Predictor

El programa *Seafood Spoilage and Safety Predictor* (SSSP v3.1) se puede descargar desde <http://sssp.dtuaqua.dk/>.⁴⁴ Presentado como *Food Spoilage and Safety Predictor* en el último Congreso de Modelización Predictiva en Alimentos (París, septiembre de 2013) y desarrollado por investigadores del *National Institute of Aquatic Resources* de la *Danish Technical University* (DTU-Aqua), este programa incluye una aplicación con un modelo de los límites de G/NG de *L. monocytogenes* en función de doce factores ambientales, con un intervalo de aplicabilidad relativamente amplio indicado en la parte superior de la captura de pantalla (véase la Figura 9).

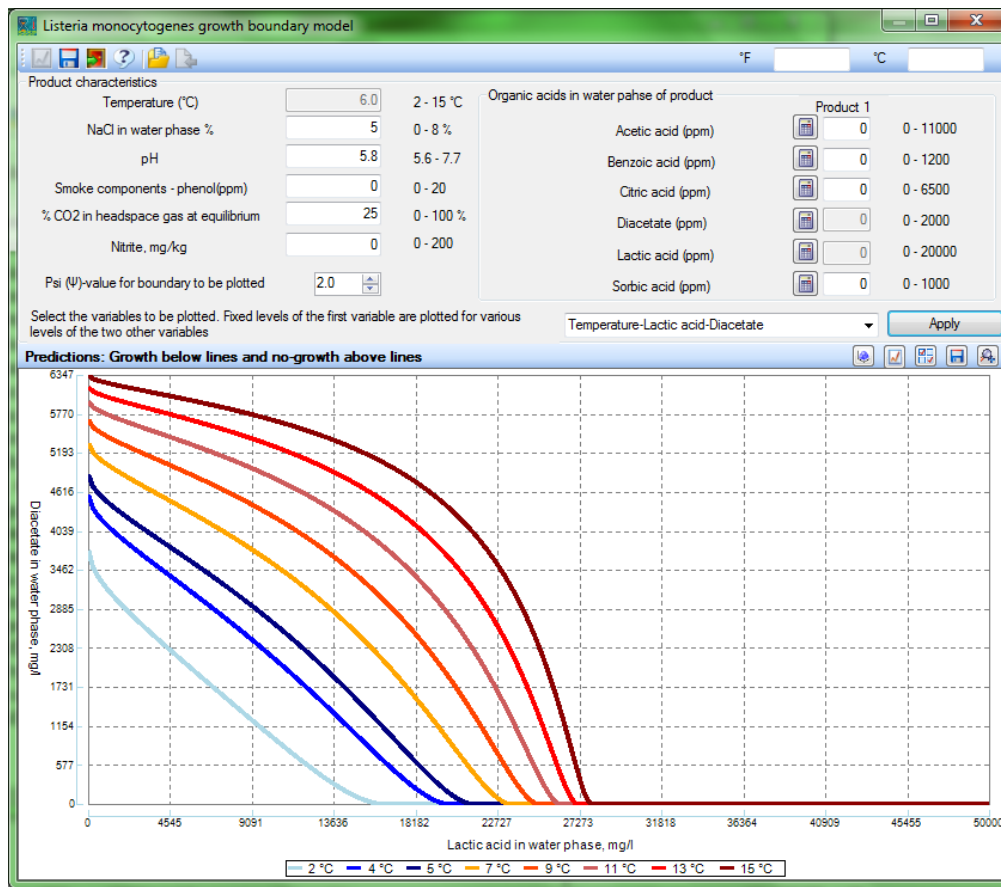


Figura 9. Captura de pantalla de la aplicació *Listeria monocytogenes growth boundary model* disponible en el programa *Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP v3.1)*.

Aunque originalmente se desarrolló para productos de la pesca,¹¹⁶ se ha validado con numerosos datos externos y se ha comprobado que también funciona correctamente con productos cárnicos listos para el consumo.¹¹⁷ En este caso, el modelo no es de tipo probabilístico, sino que predice el parámetro ψ (*psi*) como límite de crecimiento: valores $\psi > 1$ indican que las características del producto y las condiciones de conservación favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*, mientras que valores $\psi < 1$ indican que no habría crecimiento. De este parámetro se tiene que destacar que cuantifica la distancia entre una combinación de condiciones ambientales y el límite de crecimiento, teniendo en cuenta las posibles interacciones entre factores.^{110, 116} Para identificar las características de los productos que permitirían inhibir el crecimiento, se recomienda utilizar un valor $\psi = 2$. Este valor proporciona un margen de seguridad para que pequeñas variaciones de las características del producto, generalmente difíciles de evitar, no se conviertan en condiciones que favorezcan el crecimiento del patógeno.

Con todas estas herramientas se constata que a menudo la transición entre las condiciones que favorecen y las que no favorecen el crecimiento microbiano es abrupta.¹³⁴ Para determinados factores, la interfase es especialmente apretón, de aproximadamente 0,1 y 0,2

en el caso del pH, y de 0,01 y 0,03 para el a_w . Estos márgenes son de la orden de precisión de las técnicas analíticas y/o de los instrumentos de medida. Eso hace que combinaciones de condiciones muy similares tengan una probabilidad de crecimiento de entre el 50% y el 90% y, por lo tanto, haya que aplicar un margen de seguridad a la hora de identificar condiciones que no favorezcan el crecimiento de *L. monocytogenes*.^{114, 141}



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 conservación pueden hacer que un producto pase de no favorecer a favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*.

2.2.3. Pruebas de inoculación (challenge test) para determinar el potencial de crecimiento

En determinados casos, la información proveniente de la literatura científica y de la aplicación de los modelos predictivos no es suficiente o no es bastante concluyente. Entonces surge la necesidad de llevar a cabo pruebas de laboratorio específicas del tipo *challenge test*, o de inoculación del microorganismo de interés en el producto en cuestión, para estudiar el potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto en las condiciones y tiempos de conservación razonablemente posibles hasta el final de la vida útil prevista.^{24, 59, 87} Considerando que estas pruebas requieren la manipulación del patógeno, difícilmente se harán en las empresas elaboradoras.

Las pruebas de inoculación con el objetivo de determinar el potencial de crecimiento (δ) de *L. monocytogenes* son experimentos en los cuales se determina la diferencia entre la concentración del patógeno (expresada en log UFC/gr) del final y la concentración del inicio del ensayo.^{43, 59} A pesar de la aparente sencillez, para que los resultados sean fiables, representativos y puedan contribuir a la justificación científica que exige el Reglamento (CE) 2073/2005, estas pruebas se tienen que diseñar, ejecutar e interpretar adecuadamente. En este sentido, el Laboratorio Comunitario de Referencia para *L. monocytogenes* elaboró una guía técnica destinada a los laboratorios que, en colaboración con las empresas elaboradoras de los alimentos listos para el consumo, llevan a cabo los estudios de vida útil.⁴³ A partir de este documento técnico, ha habido diversos organismos e instituciones que han elaborado muchas guías a escala internacional,^{38, 46, 59, 68, 86, 119, 125} destinadas a las empresas con el objetivo de ayudarlas a identificar el riesgo de *L. monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo que producen, además de proporcionar los principios generales para decidir qué estudios de vida útil hacen falta y cuando son necesarios. Estas guías también son interesantes y útiles para la autoridad competente verificadora de la implementación de los criterios microbiológicos y los estudios de vida útil.⁵⁹

El potencial de crecimiento depende de factores como la cepa de *L. monocytogenes*, su estado fisiológico (p. ej. posible adaptación a las condiciones) y los factores intrínsecos y extrínsecos. Para tener en cuenta la variabilidad de las características del producto, se recomienda realizar la prueba en tres lotes independientes con productos de características representativas y que incluyan el peor de los casos, es decir, un escenario conservador. En relación con las cepas de *L. monocytogenes* utilizadas, convendría que incluyeran aislamientos del tipo de producto estudiado y que, antes de su inoculación, se adaptaran a las condiciones de refrigeración con que se llevará a cabo el estudio. De esta manera, se acortará la fase de latencia y contribuirá a la obtención de resultados conservadores.¹³⁵

Un aspecto clave es definir un perfil de tiempo y temperatura determinado, que simule condiciones razonablemente previsibles de la distribución y conservación del producto hasta el final de su vida útil prevista. Es responsabilidad de la empresa alimenticia y del laboratorio que realiza los ensayos trabajar conjuntamente para asegurarse que las condiciones utilizadas sean realistas. El abuso de temperatura se puede considerar a partir del valor percentil 75 de las temperaturas observadas en cada una de las etapas de la cadena del frío. La guía técnica del Laboratorio Comunitario de Referencia para *L. monocytogenes* sugiere aplicar temperaturas de 8 °C y 12 °C durante aproximadamente uno y dos tercios de la vida útil esperada, respectivamente. Se trata de temperaturas relativamente elevadas en comparación con las exigencias legales en relación con las temperaturas máximas de conservación permitidas y las recomendaciones de otros documentos guía en las cuales se sugieren temperaturas del orden de 4°C y 8 °C.^{5, 20, 148}

Las pruebas para determinar el potencial de crecimiento y los resultados obtenidos son muy específicos del producto y de las condiciones ensayadas. Generalmente, se llevan a cabo como investigaciones preliminares con el objetivo de:

- demostrar la capacidad del producto para favorecer o no el crecimiento de *L. monocytogenes*, y así clasificar el producto en la categoría 1.2 o en la categoría 1.3 del Reglamento (CE) 2073/2005;⁴¹
- cuantificar globalmente el comportamiento del patógeno en las condiciones probadas específicamente, y
- fijar límites intermedios de la concentración de *L. monocytogenes*, por ejemplo en el producto a la salida de fábrica, compatibles con el cumplimiento del criterio de 100 UFC/g hasta el final de la vida útil.

Los resultados, aunque tienen una aplicación muy directa, son específicos del producto y condiciones ensayadas y, por lo tanto, no son representativos ni se pueden utilizar en caso de que se produzcan cambios en el producto, el proceso, el tiempo, la temperatura y otras condiciones de conservación.⁵⁹

2.3. Herramientas para cuantificar la velocidad de crecimiento

Para los alimentos listos para el consumo que favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*, es clave caracterizar la velocidad de crecimiento en función de las condiciones ambientales. Se trata de estimar el tiempo en el cual, en caso de una hipotética contaminación del producto por *L. monocytogenes*, la concentración del patógeno sería compatible con el objetivo de seguridad alimentaria (es decir, 100 UFC/gr) y, en consecuencia, poder determinar la vida útil (segura) del producto garantizando el cumplimiento de los criterios microbiológicos de seguridad.

Tal como se ha enfatizado en el apartado 2.1.2, para entender y estimar como se comportará *L. monocytogenes* en un alimento listo para el consumo, los elaboradores tienen que conocer con detalle sus propiedades fisicoquímicas y químicas relevantes (valores de pH, aw, concentración de sal y conservantes, microbiota asociada, etc.), además de las condiciones de conservación razonablemente previsibles (envase, composición de la atmósfera, temperatura de conservación, etc.).

2.3.1. Modelos predictivos cinéticos

Entre las herramientas que ofrece la microbiología predictiva están los llamados modelos cinéticos sobre los parámetros de crecimiento: latencia (λ) y velocidad de crecimiento (μ).

La modelización del tiempo de latencia (adaptación) de los microorganismos es una tarea compleja, 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. En el procesamiento de los alimentos, las células de *L. monocytogenes* que pueden contaminar los productos listos para el consumo pueden presentar diversos estados fisiológicos posibles (p. ej. adaptadas al frío o a ambientes con a_w baja, dañadas subletalmente por tratamientos ácidos o térmicos, etc.). Dependiendo del estado fisiológico del microorganismo y de la magnitud 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).¹³⁴ Por lo tanto, es difícil predecir con precisión el tiempo de latencia de los microorganismos en los alimentos. Por este motivo, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, a menudo se adopta una actitud conservadora y se obvia la fase de latencia.⁵⁹

En cambio, la velocidad específica de crecimiento es un parámetro independiente del estado fisiológico del microorganismo, lo cual permite caracterizar y cuantificar la influencia de unos o más factores ambientales por medio de diferentes tipos de modelos (polinomiales, de raíz cuadrada, basados en el concepto gamma o de parámetros cardinales, etc.).¹³⁴ En la bibliografía científica se pueden encontrar muchos modelos matemáticos que describen el comportamiento de *L. monocytogenes* en diversas matrices, sean un medio de laboratorio o alimentos líquidos o sólidos, en función de factores como la temperatura, el pH, el aw (o concentración de solutos como la sal y/o el azúcar), determinados ácidos orgánicos débiles,

bacteriocinas y otros conservantes.^{12, 50, 134, 140} Muchos de estos modelos matemáticos se han construido a partir de experimentos en medios de laboratorio (caldos de cultivo) y no siempre tienen aplicaciones predictivas, ya que para éstas se requiere una validación previa que confirme la adecuación del modelo al producto y a las condiciones de conservación.

Hay modelos que se han introducido en interfaces informáticas de libre acceso (los llamados modelos terciarios) que fomentan y facilitan su uso por parte de la industria y otros sectores interesados (investigadores, asesores, autoridad competente, etc.). La **Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.** recoge herramientas predictivas de libre acceso, actualmente disponibles, relativas al crecimiento de *L. monocytogenes*, e indica los factores ambientales y el intervalo de aplicación que tienen en consideración.

Para llevar a cabo simulaciones, hay que escoger al modelo más adecuado al objetivo del estudio, que tenga en cuenta los factores más relevantes para el producto y con un intervalo de aplicación que incluya los valores de las características del producto, que previamente se habrán tenido que caracterizar, y las condiciones de conservación razonablemente previsibles.

Pathogen Modeling Program

El sistema *Pathogen Modeling Program* (PMP), del *U.S. Department of Agriculture* y disponible en <http://ars.usda.gov/services/software/download.htm?softwareid=90>, junto con el ComBase Predictor, fueron los pioneros y probablemente son los más populares. Estos sistemas incluyen modelos para diversos microorganismos. Para *L. monocytogenes*, las aplicaciones del PMP consideran la influencia de cuatro factores ambientales: el pH, el aw (o concentración de sal), la concentración de nitrito y la temperatura, en condiciones aerobias o anaerobias. Son modelos construidos a partir de datos obtenidos de ensayos en medio de cultivo, de composición más sencilla que la que normalmente presentan los alimentos. En condiciones de crecimiento alejadas de las óptimas, como las que suelen ocurrir en los alimentos (p. ej. con temperaturas de refrigeración), las predicciones de estos modelos son más inciertas y el intervalo de confianza de la predicción se ensancha.

En la [Figura 10](#) se muestra la captura de pantalla obtenida con el programa PMP (v7.0), en el que se utiliza el modelo disponible para simular el crecimiento de *L. monocytogenes* en condiciones aerobias, desarrollado en 1990 por Buchanan *et al.*²⁵ El sistema también está disponible en internet (<http://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx>), e incorpora los modelos más recientes, como los de la supervivencia de *L. monocytogenes* durante la fermentación, maduración y almacenaje de productos cárnicos fermentados,⁹³ y que no están disponibles en el PMPv7.0.

Tabla 12. Herramientas predictivas en relación con el crecimiento de *L. monocytogenes* disponibles y de libre acceso

Herramienta	Producto	Factores ambientales (intervalo de aplicación)										Otros (%)	
		T (°C)	NaCl (%)	a _w	pH	Humedad (%)	Fenol (ppm)	Nitrito (ppm)	Ácidos orgánicos ^c (%)				
PMP ¹	Medio de cultivo anaerobiosis	4-37	0,5-5	4,5-8			0-150						
	Medio de cultivo aerobiosis	4-37	0,5-10,5	4,5-7,5			0-150						
Combase Predictor ²	Medio de cultivo	1-40	0-11,4	0,92-1	4,4-7,5		0-200	láctico(0-2) acético (0-1)				CO ₂ (0-100)	
	Cárnico	2-12	1,6-6 ^a	5,4-6,6	53-78		0-150 ^b	lactato (0-3) ^c acetato (0-0,5) ^c				CO ₂ (0-100) grasa (≤10,>10)	
PURAC 2012 ⁴	Cárnico	3,3-15	0-6	0,95-1	5,8-7,2	40-100	0-200 ^b	lactato (0-4,8) ^c acetato (0-1,14) ^c acetato (0-0,24) ^c				KCl (0-6)	
MicroHibro ⁵	Cárnico cocido sin nitritos			0,96-0,99	5,9-6,9								
	Cárnico cocido con nitritos				5,9-6,9		0-315						
SSSP V 3.1 ⁶	Cárnico cocido-curado RTE		0,8-3,6			45,5-83,5		diacetatoNa (0-0,25) lactato K (0,25-9,25)					
	Lechuga	5-25											
SSSP V 3.1 ⁶	Lechuga MAP	7-30											
	Medio de cultivo	0-37		0,92-1	4,4-9,6								
SSSP V 3.1 ⁶	Productos de la pesca (validado para cárnicos)	2-15	0-8 ^a	5,6-7,7		0-20	0-200	acético (0-1,1) ^c benzoic (0-0,12) ^c cítric(0-0,65) ^c diacético (0-0,2) ^c láctico (0-2) ^c sórbico (0-0,1) ^c				CO ₂ (0-100) Interacción con bacterias del ácido láctico	

^a: en fase acuosa. ^b: añadido a la fórmula. ^c: o su sal.
¹: Pathogen Modeling Program (<http://pmp.arserrc.gov/>); ²: (<http://www.combase.cc/>); ³: Danish Meat Research Institute, Listeria growth model (<http://3.test.dezone.dk/>); ⁴: Purac® Listeria Control Model 2012 (<http://lcm.purac.com/index.php>); ⁵: (<http://www.microhibro.com/>); ⁶: Seafood Spoilage and Safety Predictor (sssp.dtuquaqua.dk)

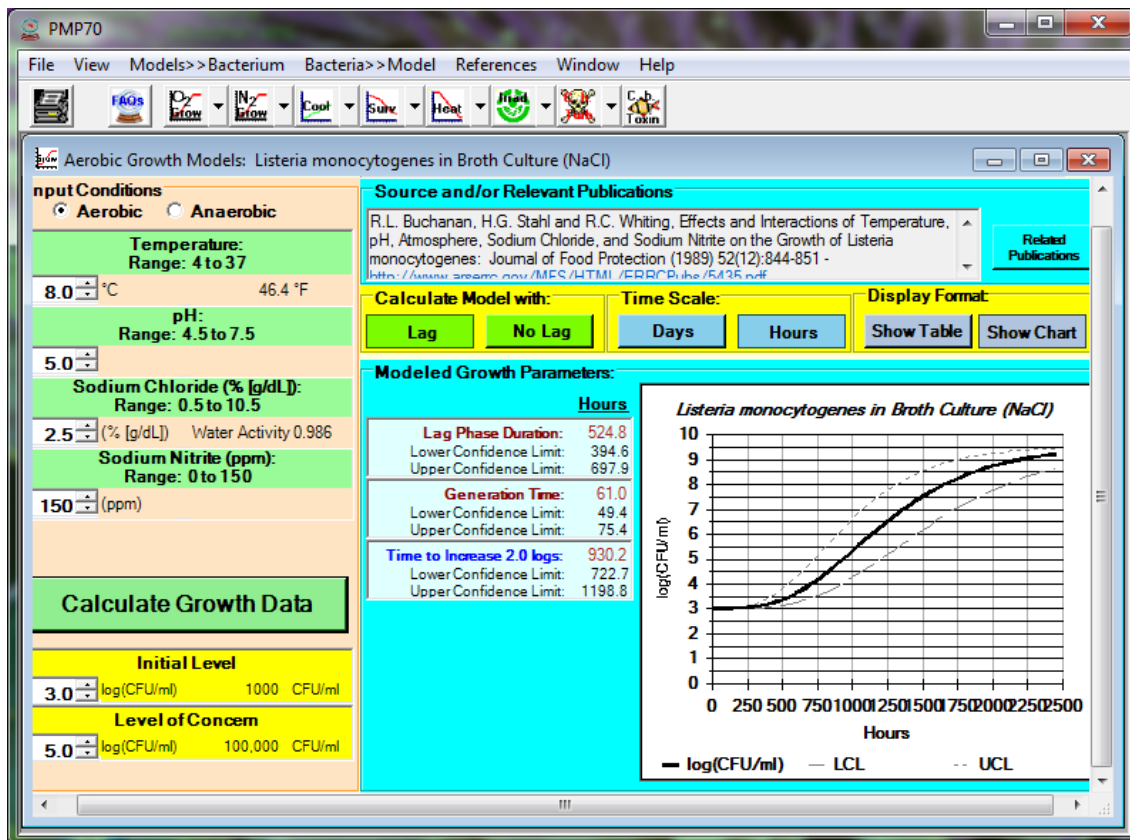


Figura 10. Captura de pantalla de la aplicación *Aerobic growth model* para *L. monocytogenes* disponible en el sistema *Pathogen Modeling Program* (PMP v7.0).

ComBase Predictor

El *ComBase Predictor*, disponible desde el portal www.combase.cc y desarrollado por investigadores del Institute for Food Research del Reino Unido, tiene aplicaciones sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en función del pH, el aw/concentración de sal, la temperatura y un cuarto factor para cada una de las cuatro aplicaciones disponibles: nitrito, CO₂, ácido láctico/lactado o bien ácido acético/acetato, respectivamente. El sistema permite comparar las predicciones que proporcionan las diferentes aplicaciones, tal como se muestra en la Figura 11. También ofrece la posibilidad de hacer simulaciones en condiciones cambiantes de temperatura. Como en el caso del PMP, los modelos del *ComBase* se basan en experimentos en medio de laboratorio, con lo cual hay que ser prudentes a la hora de interpretar las predicciones obtenidas (por ejemplo, considerando límites conservadores del intervalo de confianza de la predicción que se muestra en la mitad inferior de la Figura 11).

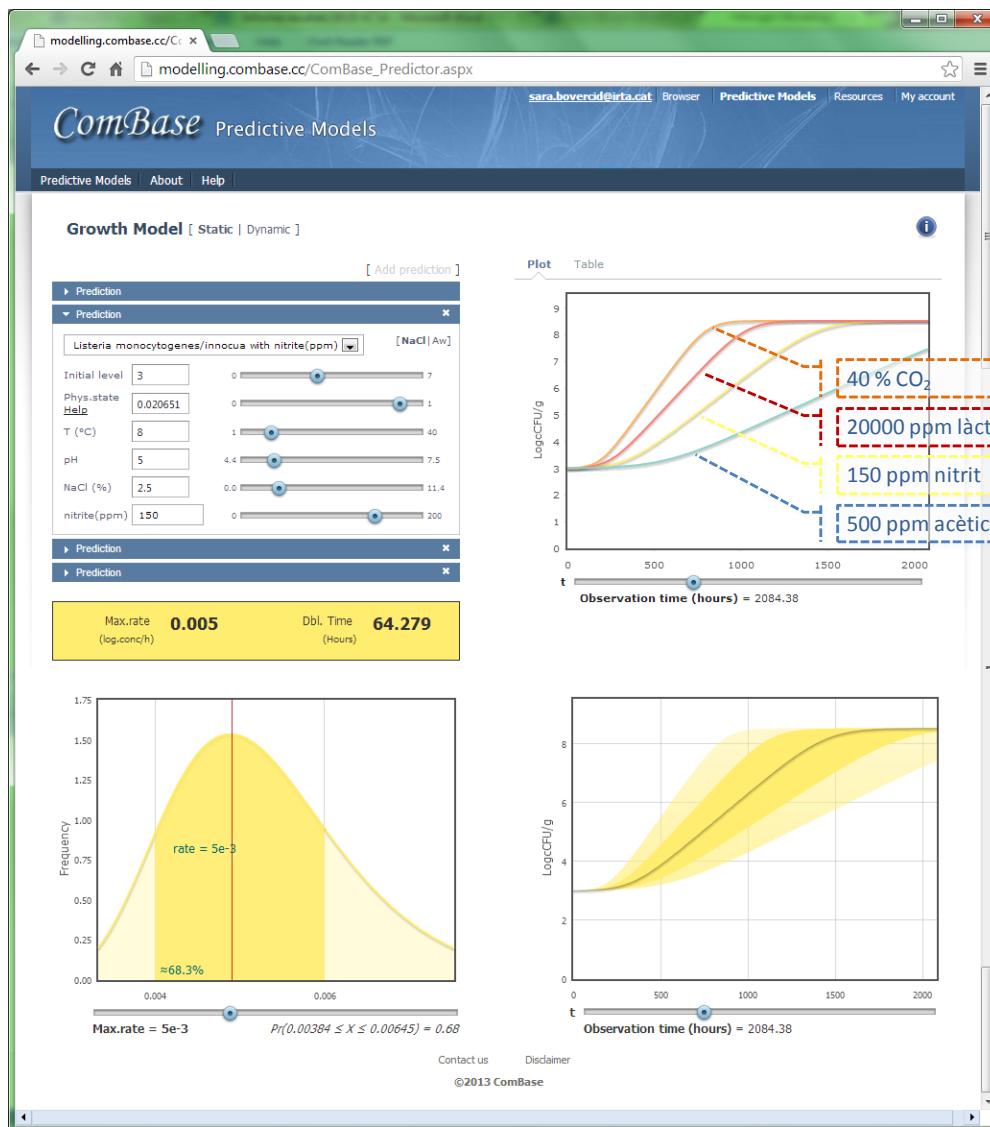


Figura 11. Captura de pantalla del sistema *ComBase Predictor* con el que se ha hecho la simulación del crecimiento de *L. monocytogenes* en cuatro condiciones ambientales diferentes.

DMRI shelf-life and safety models

Investigadores del Danish Meat Research Institute elaboraron⁸², actualizado recientemente (2013), un modelo para predecir el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos listos para el consumo, accesible en línea en <http://dmripredict.dk>. El modelo se ha construido a partir de datos experimentales obtenidos en productos cárnicos y según un procedimiento estadístico que se puede entrenar, como las redes neuronales artificiales, y no incluye la fase de latencia (perspectiva conservadora). La Figura 12 muestra la captura de pantalla de una simulación realizada con esta aplicación en línea. Las predicciones que este modelo proporciona sobre la velocidad de crecimiento en productos cárnicos cocidos son

generalmente más ajustadas a las observaciones experimentales que las de los anteriores modelos PMP y *ComBase Predictor*.^{82, 117}

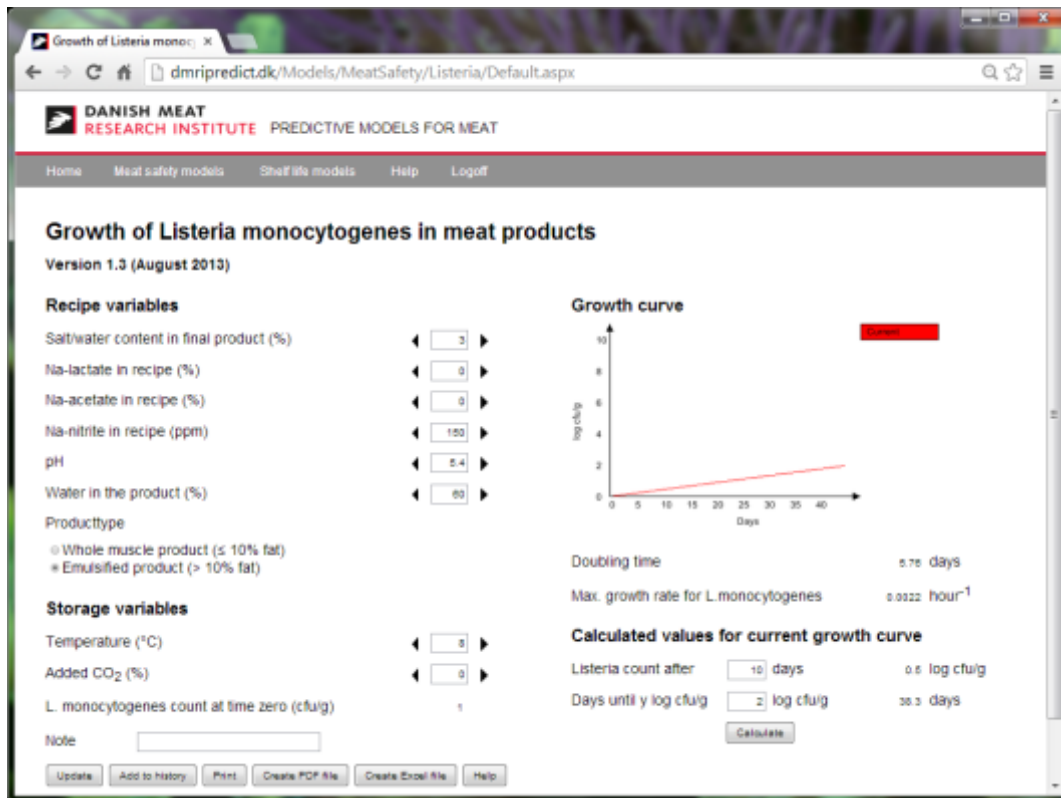


Figura 12. Captura de pantalla del sistema predictivo sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos elaborado por el DMRI.

PURAC® Listeria Control Model 2012

Sistema en línea (<http://lcm.purac.com/>) elaborado por una empresa de aditivos conservantes naturales: las sales de ácidos orgánicos débiles del tipo lactado, acetato y diacetato. El modelo está especialmente pensado para predecir el efecto de la composición de los productos cárnicos cocidos en el crecimiento de *L. monocytogenes* y valorar comparativamente el impacto de la adición de una determinada cantidad de los productos que comercializan. La Figura 13 muestra los resultados obtenidos en una simulación con el sistema.

MicroHibro

La aplicación MicroHibro, desarrollada por investigadores de la Universidad de Córdoba, y accesible desde <http://www.microhibro.com> (Figura 14), incorpora modelos predictivos disponibles a la literatura científica para que el usuario del sistema la pueda aplicar. Actualmente en versión beta, ya incorpora modelos de crecimiento en productos cárnicos y

vegetales. El sistema dispone de un mòdul per validar el model, permete al usuari entrar valors de los paràmetres de creixement determinats experimentalment i calcular los índex de validació relacionats con la exactitud y el sesgo.

Model input

	Control	With PURASAL HiPure P
Food characteristics		
Moisture	75%	75%
pH	5.8	5.8
NaCl	2.5%	2.5%
KCl	0%	0%
Sodium nitrite (ingoing)	150 ppm	150 ppm
Water activity	0.972	0.965
PURASAL HiPure P	0%	3%
Listeria growth		
Initial level	0 log	0 log
Maximum allowed level	2 log	2 log
Lag time	Default	Default
Storage conditions		
Temperature	8 °C	8 °C

Table 1. Overview of the food characteristics used to predict *Listeria* growth.

Detailed results

Table 2 shows specific growth predictions of your modeling input

Detailed results (best fit)		
	Control	3% PURASAL HiPure P
Lag time	34 days	163 days
Doubling time	37.50 hours	180.35 hours
Specific growth rate	0.444 per day	0.092 per day
Time to 2 log outgrowth		
Most probable outcome	44 days	>150 days
95% line ^a	23 days	112 days
90% line ^a	28 days	134 days

Table 2. Growth predictions of your modeling input.

Listeria growth in Pernil cuit

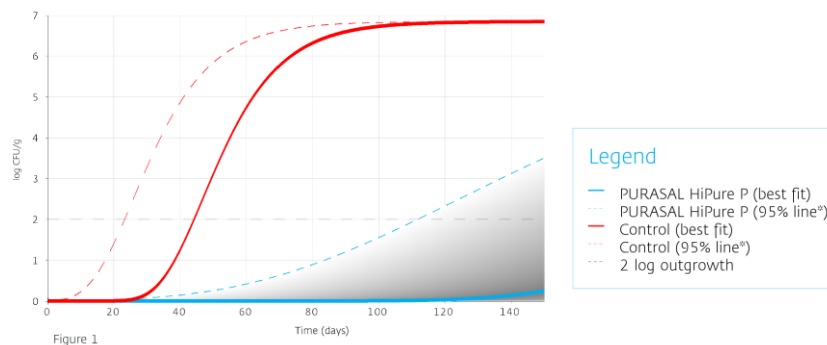


Figura 13. Extracto del informe generado por el sistema en línea PURAC® *Listeria Control Model*.

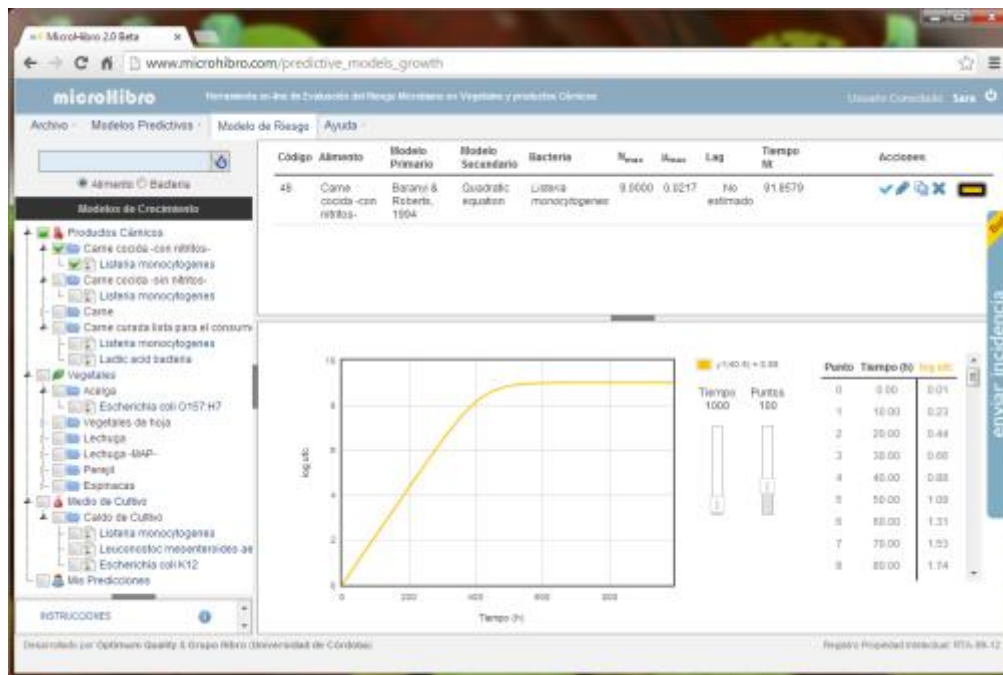


Figura 14. Captura de pantalla del sistema MicroHibro.

Seafood Spoilage and Safety Predictor

El programa *Seafood Spoilage and Safety Predictor* (SSSP v3.1) se puede descargar desde <http://sssp.dtuaqua.dk/>.⁴⁴ Incluye dos aplicaciones sobre la predicción del comportamiento de *L. monocytogenes* en función de hasta doce factores ambientales (Figura 11). El sistema dispone también de una aplicación que incluye la interacción entre *L. monocytogenes* y las bacterias del ácido láctico, principal grupo microbiano relacionado con la alteración de muchos productos listos para el consumo envasados. En todas las aplicaciones, el sistema permite hacer simulaciones en condiciones cambiantes de temperatura, y también puede importar los datos de uno registrador de temperatura (*data logger*). De entre los sistemas listados en la **Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.**, este es probablemente el más versátil gracias al gran número de factores que tiene en consideración. El modelo, originalmente construido para productos de la pesca, ha demostrado tener un buen comportamiento en otros tipos de productos, como por ejemplo los productos cárnicos cocidos.¹¹⁷ Para más información, véase el apartado 2.2.2.

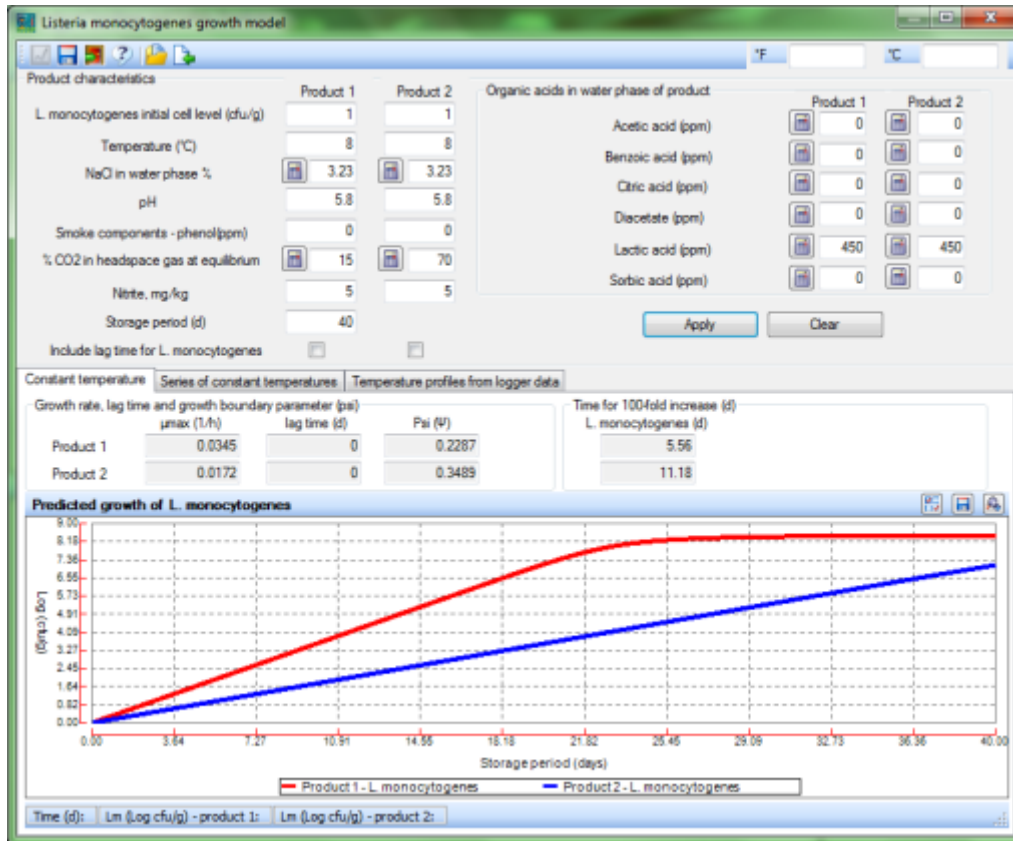


Figura 15. Captura de pantalla de la aplicación *Listeria monocytogenes growth model* disponible en el programa *Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP)*.

2.3.2. Pruebas de inoculación (challenge test) para determinar la velocidad de crecimiento

La guía técnica elaborada por el Laboratorio Comunitario de Referencia para *L. monocytogenes* destinada a los laboratorios que, en colaboración con las empresas elaboradores de los alimentos listos para el consumo, llevan a cabo los estudios de vida útil,⁴³ además de describir las pruebas de inoculación para determinar el potencial de crecimiento (δ), incluye también las pruebas de inoculación para determinar la velocidad de crecimiento (μ) de *L. monocytogenes*. Los protocolos para ambos tipos de pruebas tienen aspectos comunes, como por ejemplo el número de lotes independientes, los criterios de selección de las cepas que se tienen que inocular y la preparación de las muestras de los productos. En cambio, la preparación y el nivel de inóculo, las condiciones de temperatura, los puntos de muestreo y el cálculo y la interpretación de los resultados son diferentes segundos si se pretende evaluar el potencial de crecimiento o la velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto en cuestión.

Los protocolos para evaluar la velocidad de crecimiento combinan los ensayos de inoculación y los modelos predictivos para la interpretación y la explotación de los resultados obtenidos. Estos ensayos solucionan, en parte, las limitaciones en cuanto a la explotación de los resultados que se obtienen en los ensayos de potencial de crecimiento. Se trata de experimentos más complejos, que requieren más muestreos, conocimiento y experiencia en microbiología predictiva con el fin de aprovechar los resultados. Por eso, generalmente se reservan para una fase adelantada de los estudios de vida útil, en los casos específicos en los cuales se estima que la información adicional (valor añadido) será de utilidad.

Además de las particularidades asociadas a la preparación de las cepas e inóculos de *L. monocytogenes* que se tienen que utilizar, los ensayos para determinar la velocidad de crecimiento microbiano se tienen que realizar con una temperatura determinada y constante. Estas condiciones permiten que los resultados se puedan utilizar para estimar el parámetro cinético mediante el ajuste de modelos primarios.^{21, 91}

La temperatura del ensayo no tiene que ser necesariamente la misma que en la que se pretende hacer la predicción. La aplicación de modelos predictivos (de tipo secundario), que describen el efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes*, permite estimar la velocidad de crecimiento a temperaturas no ensayadas. A partir de estas estimaciones, incluso se puede simular el comportamiento de *L. monocytogenes* en función del perfil tiempo y temperatura representativo de las condiciones de distribución, almacenaje y venta del producto estudiado.

Los resultados obtenidos en este tipo de ensayos permiten:

- estimar la concentración del patógeno en un momento dado de la vida útil del producto a partir de una concentración inicial determinada y el perfil tiempo/temperatura de conservación;

-
- fijar límites intermedios de la concentración de *L. monocytogenes*, por ejemplo en el producto en la salida de fábrica, compatibles con el cumplimiento del criterio de 100 UFC/gr hasta el final de la vida útil.

La guía técnica del Laboratorio Comunitario de Referencia para *L. monocytogenes* sobre las pruebas de inoculación en el marco de los estudios de vida útil de los alimentos listos para el consumo consiste en unas directrices elaboradas por un grupo de expertos y avaladas por un organismo oficial.⁴³ Sin embargo, no es ninguna exigencia legal. En determinadas circunstancias, para el diseño, realización, evaluación y presentación de los resultados, puede ser útil consultar y considerar directrices disponibles en otros documentos técnicos publicados por otros organismos e instituciones internacionales.^{5, 20, 62, 86, 98, 119, 122, 125, 135, 137, 154}

3. Referencias bibliogràfiques

- [1] ADRIA développement. Sym'Previus, an operational system; 2008. Disponible en: <http://www.symprevius.org>.
- [2] AESAN. Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Dirección Ejecutiva, en relación con la aplicación de altas presiones en carne y productos cárnicos (Ref. AESA-2003-007). Revista del Comité Científico de la AESAN. 2005;1:36-71.
- [3] AESAN. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. Revista del Comité Científico de la AESAN. 2010;12:37-61.
- [4] AESAN. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. Revista del Comité Científico de la AESAN. 2011;14:43-59.
- [5] AFNOR. Hygiène des aliments - Lignes directrices pour la réalisation de tests de vieillissement microbiologique - Aliments périssables et très périssables réfrigérés NF V01-003; 2004.
- [6] Agriculture and Agri-Food Canada. HACCP generic model. Assembled meat products (pizza). Agriculture and Agri-Food Canada, Food Protection and Inspection Branch; 1995.
- [7] Alfaro B, Hernández I, García M, Lavilla M. Effect of the high pressure processing on *Listeria* spp. inactivation on smoked cod: modelling the effect of processing parameters. Presentat a la 8a International Conference on Predictive Modelling in Food. Predictive microbiology in food: Today's tools to meet stakeholders' expectations. París; 2013.
- [8] Alonso-Hernando A, Prieto M, García-Fernández C, Alonso-Calleja C, Capita R. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. Food Control. 2012;23:37-41.
- [9] ANSES i EURL for *Listeria monocytogenes*. Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes*. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*; 2012
- [10] Augustin JC, Carlier V. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. Int J Food Microbiol. 2000;56:53-70.
- [11] Augustin JC, Zuliani V, Cornu M, Guillier L. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. J Appl Microbiol. 2005;99:1019-42.
- [12] Augustin JC, Carlier V. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 2000;56:29-51.
- [13] Augustin JC, Carlier V, Rozier J. Mathematical modelling of the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. J Appl Microbiol. 1998;84:185-91.
- [14] NSW Food Authority. *Listeria* management program. NSW/FA/FI034/0809. NSW Government. Food Authority. Australia; 2008.
- [15a] Aymerich T, Bover-Cid S, Garriga M. Manual de seguretat alimentària del sector carni porcí: com gestionar els perills (INNOVACC). Fitxa 10. Programa de control de *Listeria monocytogenes*. Associació Catalana d'Innovació del sector carni porcí; 2013. <http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir3507/doc36228.html>
- [15b] en Bakker, H. C., S. Warchocki, E. M. Wright, A. F. Allred, C. Ahlstrom, C. S. Manuel, M. J. Stasiewicz, A. Burrell, S. Roof, L. Strawn, E. D. Fortes, K. K. Nightingale, D. Kephart i M. Wiedmann. 2014. Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatica* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology DOI: ijs.0.052720-0
- [16] Baranyi J, Tamplin ML. ComBase: A common database on microbial responses to food environments. J Food Prot. 2004;67:1967-71.
- [17] Bello Gutiérrez J. Estabilidad de los alimentos y tipos de alteraciones. A: Bello Gutiérrez J, editor. Ciencia Bromatológica. Principios generales de los alimentos. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2000. p. 279-87.
- [18] Ben Slama R, Miladi H, Chaieb K, Bakhrouf A. Survival of *Listeria monocytogenes* cells and the effect of extended frozen storage (-20 °C) on the expression of its virulence gene. Appl Biochem Biotechnol. 2013;170:1174-83.
- [19] Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C, et al. *Listeria fleischmannii* sp.

- nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:526-32.
- [20] Betts G. Challenge testing protocols for assessing the safety and quality of food and drink. Campden BRI Guideline nº 63; 2010.
- [21] Bover-Cid S, Garriga M. Microbiología predictiva: herramienta de soporte para la gestión de la seguridad y la calidad alimentaria Eurocarne. 2008;166:104-12.
- [22] Bover-Cid S, Belletti N, Garriga M, Aymerich T. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiol.* 2011;28:804-9.
- [23] Bover-Cid S, Garriga M. Simulador HP3: una herramienta de fácil uso para la predicción del efecto de las altas presiones en productos cárnicos. Eurocarne. 2012;206:62-7.
- [24] Bover-Cid S, Garriga M. ¿Cómo abordar la gestión de la seguridad alimentaria a través de los estudios de vida útil de acuerdo con el Reglamento (CE) 2073/2005 de criterios microbiológicos? Eurocarne. 2012;211:66-75.
- [25] Buchanan R, Phillips JG. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 1990;53:370-6.
- [26] CAC. Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods (CAC/GL-21);1997. Revisat i reanomenat 2013 Codex Alimentarius Comission.
- [27] CAC. Report of the 20th session of the Codex Committee on General Principles. París, 3-7 de maig de 2004. ALINORM 04/27/33A, Appendix II.
- [28] CAC. 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 (anexos II i III adoptats el 2009). Codex Alimentarius; 2007.
- [29] CAC. Proposed draft Annex II: microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (ALINORM 09/32/13). 32a sessió. Roma. Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Food Standards Programme; 2009.
- [30] Carpentier B, Cerf O. Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol.* 2011;145:1-8.
- [31] Carrasco E, Valero A, Pérez-Rodríguez F, García-Gimeno RM, Zurera G. Management of microbiological safety of ready-to-eat meat products by mathematical modelling: *Listeria monocytogenes* as an example. *Int J Food Microbiol.* 2007;114:221-6.
- [32] CCA. Informe del 27º período de sesiones alinorm 04/27/41. Apéndice II propuestas de enmiendas al manual de procedimiento; 2004.
- [33] CCFRA. Evaluation of product shelf-life for chilled foods. Guideline 46. Campden and Chorlewood Food Research Association; 2004.
- [34] CCFRA. Pasteurization: a food industry practical guide (Second Edition). Guideline 51. Campden and Chorlewood Food Research Association; 2006.
- [35] CDC. *Listeria* (Listeriosis). Statistics. Centers for Disease Control and Prevention; 2013.
- [36] Center for Meat Process Validation. Shelf Stability Predictor. Board of Regents of the University of Wisconsin System; 2009. Disponible en: http://www.meathaccp.wisc.edu/ST_calc.html.
- [37] CFA. Guidance on practical implementation of the EC regulation on microbiological criteria for foodstuffs. British Retail Consortium, Chilled Food Association; 2006.
- [38] CFA. Shelf life of ready to eat food in relation to *L. monocytogenes* - Guidance for food business operators. Chilled Food Association, British Retail Consortium, Food Standards Agency; 2010.
- [39] CFIA. Guidelines on the control measures for preventing the contamination and growth of *Listeria monocytogenes*. Facilities Inspection Manual - Appendix I. Canadian Food Inspection Agency. Health Canada; 2010.
- [40] Chen H, Hoover DG. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2004;5:269-76.
- [41] Reglament (CE) núm. 2073/2005 de la Comissió, de 15 de novembre de 2005, relatiu als criteris microbiològics aplicables als productes alimentaris (DOUE L 338 de 22.12.2005).
- [42] Costa AIA, Dekker M, Beumer RR, Rombouts FM, Jongen WMF. A consumer-oriented classification system for home meal replacements. *Food Qual Prefer.* 2001;12:229-42.
- [43] CRL/AFSSA. Technical guidance document. On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 2, November 2008 (correction 29/04/2009). EU Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments; 2008. Actualització disponible: versió 3 (06/06/2014).
- [44] Dalgaard P. Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) software v. 3.1; 2009. Disponible a: <http://sssp.dtuqua.dk/>.
- [45] Devlieghere F, Geeraerd AH, Versyck KJ, Vandewaetere B, Van Impe J, Debevere J. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified

- atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiol.* 2001;18:53-66.
- [46] Dirección General de Ordenación e Inspección - Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Documentos Técnicos de Higiene y Seguridad Alimentaria nº 6; 2012.
- [47] Doyle ME, Mazzotta AS, Wang T, Wiseman DW, Scott VN. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 2001;64:410-29.
- [48] ECFF. Recommendations for the production of prepackaged chilled food. European Chilled Food Federation; 2006.
- [49] EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. *EFSA Journal.* 2007;599:1-42.
- [50] EFSA. Scientific Opinion on public health risks represented by certain composite products containing food of animal origin. *EFSA Journal.* 2012;10:2662 [132 p].
- [51] EFSA. Scientific Opinion on the development of a risk ranking framework on biological hazards. *EFSA Journal.* 2012;10:2724-812.
- [52] EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *The Journal.* 2013;11:1-250.
- [53] EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011. Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal.* 2013;11:1-75.
- [54] EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12:3547-859.
- [55] Endrikat S, Gallagher D, Pouillot R, Hicks Quesenberry H, Labarre D, Schroeder CM, et al. A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retail-sliced deli meat. *J Food Prot.* 2010;73:612-9.
- [56] Erkmen O, Dogan C. Effects of ultra high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* and natural flora in broth, milk and fruit juices. *Int J Food Sci Technol.* 2004;39:91-7.
- [57] European Commission. Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU Food and Feed legislation. DG Health and Consumers. Animal Nutrition. Sampling and Analysis Methods; 2004.
- [58] European Commission. Guidance document on official controls, under Regulation (EC) No 882/2004, concerning microbiological sampling and testing of foodstuffs. Commission of the European Communities. Health and Consumer Protection Directorate-General; 2006.
- [59] European Commission. Commission staff working document. Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. SANCO/1628/2008 ver. 9.3 (26/11/2008). Commission of the European Communities; 2008.
- [60] FAO. Report of the FAO Expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. FAO Fisheries Report No. 604 (FIU/ESNS/R604); 1999.
- [61] FAO/WHO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical Report. Part 3. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organisation; 2004.
- [62] FDA. Microbiological challenge testing. A: Safe practices for food processes. Evaluation and definition of potentially hazardous foods. U.S. Food and Drug Administration; 2009. Disponible a: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094154.htm> [accedit el 19 d'abril de 2012].
- [63] FDA. Purpose and Definitions. A: FDA, ed. Food Code 2009. Silver Spring: U.S. Food and Drug Administration; 2009.
- [64] FDA/UDSA. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Department of Agriculture, U.S. Food and Drug Administration; 2003.
- [65] Flessa S, Lusk DM, Harris LJ. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *Int J Food Microbiol.* 2005;101:255-62.
- [66] FSAI. Guidance Note No. 18: Determination of Product Shelf-Life. Food Safety Authority of Ireland; 2005.
- [67] FSAI. Guidance Note No. 26: Guidance for Food Business Operators on the Implementation of Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. Food Safety Authority of Ireland; 2011.

- [68] FSAI. Guidance Note No. 18: Validation of Product Shelf-Life (Revision 1). Food Safety Authority of Ireland; 2011.
- [69] FSAI. The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food. Food Safety Authority of Ireland ;2005.
- [70] FSANZ. Supporting document 1. Guidance on the application of microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in RTE food - Proposal P1017. Criteria for *Listeria monocytogenes* - microbiological limits for foods. Food Standards Australia New Zealand; 2013.
- [71] FSIS. FSIS Compliance guideline: controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. Food Service and Inspection Service. U.S. Department of Agriculture; 2012.
- [72] FSIS. FSIS Compliance guideline: controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. Food Service and Inspection Service. U.S. Department of Agriculture; 2014.
- [73] Gallagher DL, Ebel ED, Kause JR. FSIS Risk assessment for *Listeria monocytogenes* in deli meats. FDA/FSIS; 2003.
- [74] Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol. 2007;113:1-15.
- [75] Garrido V, Vitas AI, García-Jalón I. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. Food Control. 2009;20:986-91.
- [76] Garrido V, Vitas AI, García-Jalón I. The problem of listeriosis and ready-to-eat products: prevalence and persistence. A: Méndez-Vilas A, editor. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz: Formatex; 2010. p. 1182-98.
- [77] Garriga M, Aymerich MT, Hugas M. Tecnologías emergentes en la conservación de productos cárnicos: altas presiones hidrostáticas en jamón cocido loncheado. Eurocarne. 2002;104:77-84.
- [78] Gianfranceschi M, Gattuso A, Fiore M, D'Ottavio M, Casale M, Palumbo A, et al. Survival of *Listeria monocytogenes* in Uncooked Italian Dry Sausage (Salami). J Food Prot. 2006;69:1533-8.
- [79] González D, Vitas AI, Díez-Leturia M, García-Jalón I. *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: Study of prevalence and temperatures at retail. Food Microbiol. 2013;36:374-8.
- [80] Gorris LGM. Food safety objective: An integral part of food chain management. Food Control. 2005;16:801-9.
- [81] Guillet C, Join-Labert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechai F, Mamzer-Bruneel MF, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerg Infect Dis. 2010;16:136-8.
- [82] Gunvig A, Blom-Hanssen J, Jacobsen T, Hansen F, Borggaard C. A predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in meat products with seven different hurdle variables. Presentat a la 5a International Conference Predictive Modelling in Foods ICPMF2007: Atenes, 16-19 de setembre de 2007.
- [83] Harrison MA, Huang YW, Chao CH, Shineman T. Fate of *Listeria monocytogenes* on packaged, refrigerated, and frozen seafood. J Food Prot. 1991;54:524-7.
- [84] Hayman MM, Kouassi GK, Anantheswaran RC, Floros JD, Knabel SJ. Effect of water activity on inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactate dehydrogenase during high pressure processing. Int J Food Microbiol. 2008;124:21-6.
- [85] Health Canada. Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat foods (DF-FSNP 0071); 2011.
- [86] Health Canada. *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Refrigerated Ready-to-Eat Foods Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, Health Products and Food Branch. Health Canada; 2012.
- [87] Health Canada. Validation of ready-to-eat foods for changing the classification of a category 1 into a category 2A or 2B food in relation to Health Canada's Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (2011). Bureau of Microbial Hazards. Food Directorate. Health Products and Food Branch. Health Canada; 2012.
- [88] Heinz G, Hautzinger P. Meat processing technology for small- to medium-scale producers. A: Food and Agriculture Organization of the United Nations, editor. Bangkok: FAO Regional Office for Asia and the Pacific; 2007.
- [89] Hereu A, Dalgaard P, Garriga M, Aymerich T, Bover-Cid S. Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. Innov Food Sci Emerg Technol. 2012;16:305-15.
- [90] Hoelzer K, Sauders BD, Sánchez MD, Olsen PT, Pickett MM, Mangione KJ, et al. Prevalence, distribution, and diversity of *Listeria monocytogenes* in retail environments, focusing on small establishments and establishments with a history of failed inspections. J Food Prot. 2011;74:1083-95.
- [91] Huang L. IPMP 2013 - A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. Int J Food Microbiol. 2014;171:100-7.

- [92] Hudson JA, Mott SJ, Penney N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J Food Prot.* 1994;57:204-8.
- [93] Hwang CA., Porto-Fett ACS, Juneja VK, Ingham SC, Ingham BH, Luchansky JB. Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium during fermentation, drying, and storage of soudjouk-style fermented sausage. *Int J Food Microbiol.* 2009;129:244-52.
- [94] ICMSF. Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Londres: Blackie Academic & Professional; 1996.
- [95] ICMSF. Microorganisms in food 7: Microbial testing in food safety management. Nova York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002.
- [96] ICMSF. Applications and use of criteria and other tests. A: International Commission on Microbiological Specifications for Foods, editor. Microorganisms in food 8. Use of data for assessing process control and product acceptance. Nova York, Dordrecht, Heidelberg, Londres: Springer; 2011. p. 63-73.
- [97] ICMSF. Sampling considerations and statistical aspects of sampling plans. A: International Commission on Microbiological Specifications for Foods, editor. Microorganisms in food 8. Use of data for assessing process control and product acceptance. Nova York, Dordrecht, Heidelberg, Londres: Springer; 2011. p. 355-64
- [98] IFT. Microbiological challenge testing. Evaluation and definition of potentially hazardous foods. A report of the Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration of the United States Department of Health and Human Services. December 31, 2001. IFT/FDP Contract no. 223-98-2333. Task Order No. 4. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2003;2:46-50.
- [99] ILSI Research Foundation/Risk Science Institute; Expert Panel on *Listeria monocytogenes* in Foods. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - a risk-based approach. *J Food Prot.* 2005;68:1932-94.
- [100] Ingham SC, Borneman DL, Ané C, Ingham BH. Predicting growth-no growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged ready-to-eat meats. *J Food Prot.* 2010;73:708-14.
- [101] Jofré A, Garriga M. ¿Cuál es la problemática de *Listeria monocytogenes* en la industria cárnica? *Revista de la Asociación de Industrias de la Carne de España*, juny de 2011:36-42.
- [102] Keto-Timonen R, Tolvanen R, Lundén J, Korkeala H. An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *J Food Prot.* 2007;70:1866-73.
- [103] Koseki S. MRV Microbial Response Viewer; 2009. Disponible a: <http://mrv.nfri.affrc.go.jp/>.
- [104] Koseki S. Microbial Responses Viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *Int J Food Microbiol.* 2009;134:75-82.
- [105] Koutsoumanis K, Angelidis AS. Probabilistic modeling approach for evaluating the compliance of ready-to-eat foods with new European Union safety criteria for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:4996-5004.
- [106] Koutsoumanis KP, Kendall PA, Sofos JN. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiol.* 2004;21:415-22.
- [107] Koutsoumanis KP, Sofos JN. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2005;104:83-91.
- [108] Lado BH, Yousef AE. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. A: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* 3a ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 157-213.
- [109] Lambertz ST, Nilsson C, Bradenmark A, Sylvén S, Johansson A, Jansson LM, et al. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *Int J Food Microbiol.* 2012;160:24-31.
- [110] Le Marc Y, Huchet V, Bourgeois CM, Guyonnet JP, Mafart P, Thuault D. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int J Food Microbiol.* 2002;73:219-37.
- [111] Leistner L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol.* 2000;55:181-6.
- [112] Lianou A, Sofos JN. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Prot.* 2007;70:2172-98.
- [113] Luber P, Crerar S, Dufour C, Farber J, Datta A, Todd ECD. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization - Recommendations for improved prevention and control. *Food Control.* 2011;22:1535-49.

- [114] McMeekin TA, Presser KA, Ratkowsky D, Ross T, Salter M, Tienungoon S. Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *Int J Food Microbiol.* 2000;55:93-8.
- [115] Mejlholm O, Dalgaard P. Modeling and predicting the growth boundary of *Listeria monocytogenes* in lightly preserved seafood. *J Food Prot.* 2007;70:70-84.
- [116] Mejlholm O, Dalgaard P. Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for *Listeria monocytogenes* in lightly preserved and ready-to-eat shrimp. *J Food Prot.* 2009;72:2132-42.
- [117] Mejlholm O, Gunvig A, Borggaard C, Blom-Hanssen J, Mellefont L, Ross T, et al. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* — An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *Int J Food Microbiol.* 2010;141:137-50.
- [118] MPI. Pathogen data sheets. *Listeria monocytogenes*. Ministry for Primary Industries. New Zealand Government; 2001.
- [119] MPI. How to determine the shelf-life and date marking of food. A draft guidance document. Ministry for Primary Industries. New Zealand Government; 2012.
- [120] Murphy RY, Duncan LK, Driscoll KH. D and z values of *Salmonella*, *Listeria innocua*, and *Listeria monocytogenes* in fully cooked poultry products. *J Food Sci.* 2003;68:1443-7.
- [121] NACMCF. Considerations for establishing safety-based consume-by date labels for refrigerated ready-to-eat foods. *J Food Prot.* 2005;68:1761-75.
- [122] NACMCF. Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. *J Food Prot.* 2010;73:140-202.
- [123] NSW Food Authority. Survey of *Listeria monocytogenes* in sliced pre-packaged RTE meats. NSW/FA/FI177/1305. NSW Government. Food Authority. Australia; 2013.
- [124] Nucera D, Lomonaco S, Bianchi DM, Decastelli L, Grassi MA, Bottero MT, et al. A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related environments. *Int J Food Microbiol.* 2010;140:271-6.
- [125] NZFSA. A guide to calculating the shelf life of foods. Information booklet for the food industry. New Zealand Food Safety Authority; 2005.
- [126] Palumbo SA, Williams AC. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiol.* 1991;8:63-8.
- [127] Pereira da Silva E, Pereira De Martinis EC. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:957-68.
- [128] Pérez-Rodríguez F, Valero A. Predictive models: foundation, types and development. A: Pérez-Rodríguez F, Valero A, editors. *Predictive microbiology in foods*. Heidelberg: Springer; 2012. p. 25-56.
- [129] Pradhan AK, Ivanek R, Gröhn YT, Bukowski R, Geornaras I, Sofos JN, et al. Quantitative Risk Assessment of Listeriosis-associated deaths due to *Listeria monocytogenes* contamination of deli meats originating from manufacture and retail. *J Food Prot.* 2010;73:620-30.
- [130] Rendueles E, Omer MK, Alvseike O, Alonso-Calleja C, Capita R, Prieto M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *Lebenson Wiss Technol.* 2011;44:1251-60.
- [131] Resnik SL, Chirife J. Proposed theoretical a_w values at various temperatures for selected solutions to be used as reference sources in the range of microbial growth. *J Food Prot.* 1988;51:419-23.
- [132] Ritz M, Jugiau F, Rama F, Courcoux P, Semenou M, Federighi M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiol.* 2000;17:375-82.
- [133] Ross T, Dalgaard P, Tienungoon S. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol.* 2000;62:231-45.
- [134] Ross T, Dalgaard P. Secondary models. A: McKellar R, Lu X, editors. *Modeling microbial responses in food*. Boca Raton: CRC Press; 2004.
- [135] Ross T. Challenge Testing of Microbiological Safety of Raw Milk Cheeses: The Challenge Trial Toolkit. MAF Technical Paper No: 2011/51. Ministry of Agriculture and Forestry. New Zealand Food Safety Authority; 2011.
- [136] Sauders BD, Wiedmann M. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. A: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3a ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 21-53.
- [137] Scott VN, Swanson KMJ, Freier TA, Pruett WP, Sveum WH, Hall PA, et al. Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food Prot Trends.* 2005;25:818-25.
- [138] Stella P, Cerf O, Hugas M, Koutsoumanis KP, Nguyen-The C, Sofos JN, et al. Ranking the microbiological safety of foods: A new tool and

- its application to composite products. Trends Food Sci Technol. 2013;33:124-38.
- [139] Stewart CM, Tompkin RB, Cole MB. Food safety: new concepts for the new millennium. Innov Food Sci Emerg Technol. 2002;3:105-12.
- [140] te Giffel MC, Zwietering, MH. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 1999;46:135-49.
- [141] Tienungoon S, Ratkowsky DA, McMeekin TA, Ross T. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. Appl Environ Microbiol. 2000;66:4979-87.
- [142] Tompkin RB, Scott VN, Bernard DT, Sveum WH, Gombas KS. Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. Dairy, Food and Environmental Sanitation. 1999;19:551-62.
- [143] Tompkin RB. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J Food Prot. 2002;65:709-25.
- [144] Tonello C. 2011. Case studies on high-pressure processing of foods. A: Zhang HQ, Barbosa-Cánovas GV, Balasubramaniam VM, Dunne CP, Farkas DF, Yuan JTC, editors. Nonthermal processing technologies for food. Oxford: Willey-Blackwell; 2011. p. 36-50.
- [145] Reglament (UE) núm. 1169/2011 del Parlament Europeu i del Consell, de 25 d'octubre de 2011, referent a la informació alimentària facilitada al consumidor (DOUE L 304 de 22.11.2011).
- [146] USDA i FDA. 2008. Guidance for industry: control of *Listeria monocytogenes* in refrigerated or frozen ready-to-eat foods; Draft guidance. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition; 2008.
- [147] USDA. Draft Interagency Risk Assessment - *Listeria monocytogenes* in retail delicatessens. Technical report. U.S. Department of Agriculture. Food and Drug Administration; 2013.
- [148] Uyttendaele M, Rajkovic A, Benos G, François K, Devlieghere FA, Debevere J. Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 2004;90:219-36.
- [149] Uyttendaele M, Busschaert P, Valero A, Geeraerd AH, Vermeulen A, Jacxsens L, et al. Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. Int J Food Microbiol. 2009;133:94-104.
- [150] van Asselt ED, Zwietering MH. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. Int J Food Microbiol. 2006;107:73-82.
- [151] van Lieverloo JHM, de Roode M, Fox MB, Zwietering MH, Wells-Bennik MHJ. Multiple regression model for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in liquid food products. Food Control. 2013;29:394-400.
- [152] van Schothorst M. A proposed framework for the use of FSOs. Food Control. 2005;16:811-6.
- [153] Vermeulen A, Smigic N, Rajkovic A, Gysemans K, Bernaerts K, Geeraerd AH, et al. Performance of a growth-no growth model for *Listeria monocytogenes* developed for mayonnaise-based salads: influence of strain variability, food matrix, inoculation level and presence of sorbic and benzoic acid. J Food Prot. 2007;70:2118-26.
- [154] Vermeulen A, Devlieghere F, De Loy-Hendrickx A, Uyttendaele M. Critical evaluation of the EU-technical guidance on shelf-life studies for *L. monocytogenes* on RTE-foods: A case study for smoked salmon. Int J Food Microbiol. 2011;145:176-85.
- [155] Vitas AI, Aguado V, García-Jalón I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). Int J Food Microbiol. 2004;90:349-56.
- [156] Walls I, Scott VN. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. Int J Food Microbiol. 1997;36:97-102.
- [157] Warriner K, Namvar A. What is the hysteria with *Listeria*? Trends Food Sci Technol. 2009;20:245-54.
- [158] WTO. Agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures (SPS Agreement). World Trade Organization; 1995.
- [159] Yoon Y, Kendall PA, Belk KE, Scanga JA, Smith GC, Sofos JN. 2009. Modeling the growth/no-growth boundaries of postprocessing *Listeria monocytogenes* contamination on frankfurters and bologna treated with lactic acid. Appl Environ Microbiol. 2009;75:353-8.
- [160] Zwietering M, Sestoft P. Microbiological sampling plans: a tool to explore ICMSF recommendations. v2.05. Wageningen: International Commission on Microbial Specifications for Foods; 2009. Disponible a: http://www.icmsf.org/main/software_downloads.html.

4. Anexos

Anexo 1. Funcionamiento de los planes de muestreo. Criterios microbiológicos.

En el ámbito de la gestión de los riesgos microbiológicos, el análisis del producto final de acuerdo con unos criterios microbiológicos establecidos a partir de un análisis de riesgos se considera una herramienta para determinar la aceptabilidad de lotes de producción y verificar el control general del proceso de producción en el marco del APPCC.^{28, 41}

El presente anexo trata de los planes de muestreo que forman parte de los criterios microbiológicos incluidos en el Reglamento (CE) 2073/2005, y también de las características que determinan el funcionamiento y nivel de confianza de los resultados obtenidos. Para este fin se ha tenido en cuenta el fundamento estadístico que da apoyo a los planes de muestreo, según las directrices y consideraciones formuladas por la [International Commission on Microbiological Specifications for Foods](#) (ICMSF).⁹⁷

Los criterios microbiológicos comprenden dos tipos de planes de muestreo por atributos: los de dos clases de atributos, para evaluar datos cualitativos (presencia/ausencia); y el de tres clases de atributos, para evaluar datos cuantitativos (recuentos). La toma de decisiones en relación con la aceptación de lotes analizados se basa en los parámetros siguientes:

n: número de unidades (muestras) del lote que se tienen que analizar

c: número máximo de unidades permitidas con resultados marginales pero aceptables (es decir, entre m y M)

m: concentración del peligro microbiológico que separa los resultados satisfactorios de los marginalmente aceptables

M: concentración del peligro que separa los resultados marginalmente aceptables de los no satisfactorios (inaceptables)

En cuanto a los peligros microbiológicos (microorganismos patógenos) a los cuales se aplica la tolerancia cero, se definen planos de muestreo de dos clases de atributos, en los cuales el valor c es cero y, por lo tanto, el límite máximo de aceptabilidad es $m = M$ (ausencia en la alícuota analítica establecida, p. ej. 25 gr).

Sin embargo, la no detección del peligro (resultado «negativo») no es garantía de riesgo cero y es posible que un plan de muestreo pueda ocasionalmente aceptar un lote contaminado. El riesgo de tomar una decisión errónea se reduce si se incrementa el rigor del plan de muestreo (p. ej., al incrementar n). En la práctica, sin embargo, los criterios microbiológicos se

establecen como una solución de compromiso entre un número asumible de unidades que hay que analizar y una probabilidad tolerable de aceptar lotes contaminados (generalmente del 5%).

Para comprender el funcionamiento de los planes de muestreo, y para comparar el rigor y/o la confianza de diferentes planes de muestreo, se utiliza la representación gráfica de la curva característica de operación (OC, del inglés *Operating Characteristic curve*),^{26, 160} como las que se muestran en la **Figura 16**. Estas curvas representan, para un determinado plan de muestreo (según n y c), la probabilidad de aceptación (P_a) de un lote en función de la proporción real de unidades defectuosas o no conformes (es decir, unidades de productos contaminados a un nivel superior a $m = M$) en el lote analizado.

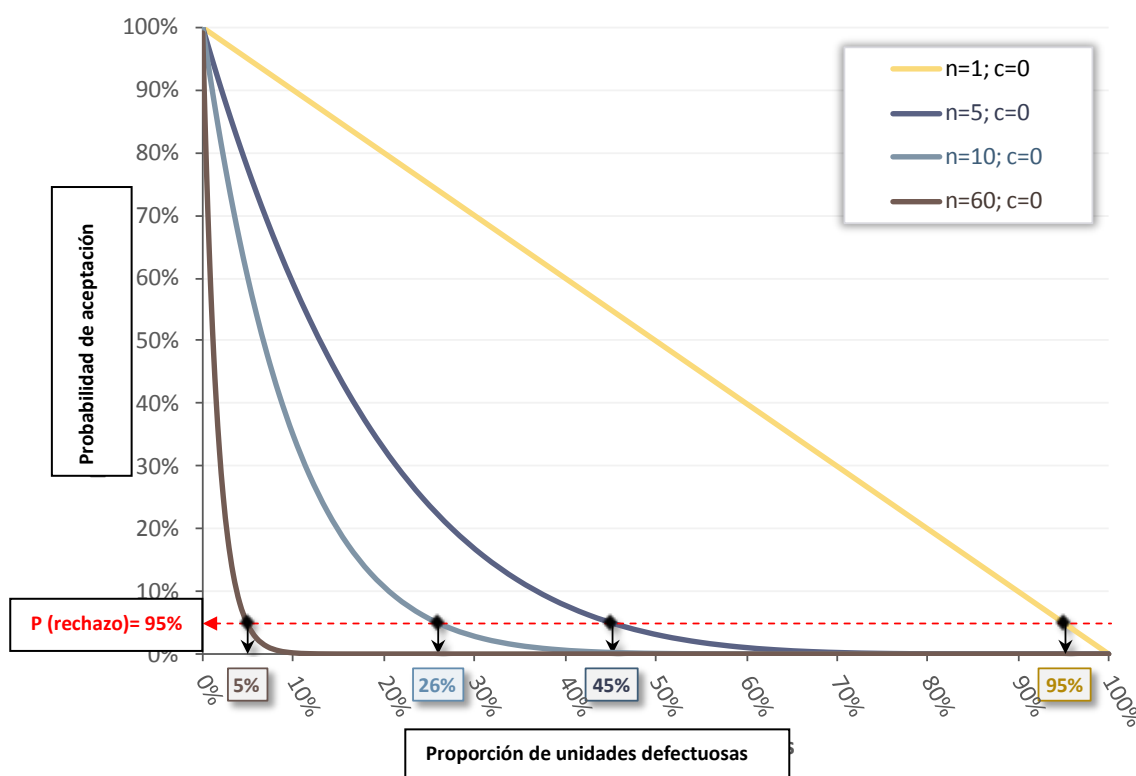


Figura 16. Curva característica de operación para diferentes planes de muestreo de dos clases de atributos. Relación entre la probabilidad de aceptación (P_a) y la proporción de unidades defectuosas.

[Representación gráfica obtenida a partir de los datos proporcionados por la hoja de cálculo elaborado por la ICMSF.¹⁶⁰ Se asume una distribución log normal de la concentración del patógeno con una desviación estándar de 0,8].

Con el plan de muestreo $n = 5$, $c = 0$, fijado en los criterios microbiológicos del Reglamento (CE) 2073/2005⁴¹ para los alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el crecimiento de

L. monocytogenes (categoría 1.2a, apartado 1.3.2, [Tabla 7](#)), se rechazarían los lotes con al menos un 45% de las unidades contaminadas a niveles iguales o superiores al límite de detección del protocolo de investigación de la presencia/ausencia de *L. monocytogenes*, p. ej. 1 célula viable/25 g. Estadísticamente, el riesgo de aceptar un lote no conforme es del 5%; por lo tanto, la confianza en la no aceptación del lote defectuoso es del 95%.

Al incrementar el número de unidades que hay que analizar (n) se pueden detectar, y no aceptar como correctos, lotes con una proporción más baja de unidades contaminadas. Por ejemplo, si se analizan $n = 10$ (asumiendo $c = 0$; categoría 1.1. de los criterios microbiológicos apartado 1.3.2, [Tabla 7](#)), se consigue rechazar lotes con el 26% de las unidades contaminadas.

La [Figura 16](#) ilustra la escasa confianza que proporciona el análisis de una sola unidad ($n = 1$) a la hora de evaluar la aceptabilidad de un determinado lote. En estas circunstancias, para no aceptar el lote, haría falta que al menos el 95% de las unidades del lote estuvieran contaminado para *L. monocytogenes*, a niveles analíticamente detectables.

En otras palabras, si con $n = 10$ ($c = 0$) el riesgo de aceptar un determinado lote no conforme, según lo que se ha descrito anteriormente, es sólo del 5%, el riesgo de aceptación de este mismo lote contaminado se incrementa hasta un 22% con $n = 5$, y hasta un 74% con $n = 1$.

En general, se asume que la concentración de *L. monocytogenes* en los alimentos sigue una distribución de tipo log normal, de manera que la concentración expresada en unidades logarítmicas sigue una distribución normal. A partir de esta distribución se puede estimar la media (media geométrica o mediana) de la concentración del patógeno que permitiría rechazar el lote con un 95% de probabilidad. En los casos de los planes de muestreo incluidos en la [Figura 16](#), la media geométrica de la concentración del patógeno en el lotes rechazados varía de 1 UFC/1,3 gr (para el plan de muestreo con $n = 1$; $c = 0$) en 1 UFC/2 kg (para el de $n = 60$; $c = 0$) ([Tabla 11](#)).

Tabla 11. Funcionamiento de diferentes planes de muestreo en términos de proporción de unidades defectuosas (con concentración de patógeno igual o superior a 1 UFC/25 g) y media geométrica de la concentración del patógeno en lotes que se rechazarían con una probabilidad del 95%.^a

Plan de muestreo	$n = 1; c = 0$	$n = 5; c = 0$	$n = 10; c = 0$	$n = 60; c = 0$
Proporción de unidades defectuosas	95%	45%	21%	5%
Media geométrica (mediana) de la concentración del patógeno	1 UFC/1,3 g	1 UFC/55 g	1 UFC/178 g	1 UFC/2 kg

^a: Límite de aceptabilidad $m = M = \text{aus.}/25 \text{ g}$. Se asume que la concentración de *L. monocytogenes* en el lote sigue una distribución de tipo log normal, con una desviación estándar de 0,8.

En definitiva, de estos razonamientos estadísticos se puede extraer que el análisis de = 5 unidades de producto de un lote con todos los resultados conformes (es decir, abs/25 gr del patógeno) sólo garantiza que la media geométrica de la concentración de *L. monocytogenes* en este lote será inferior a 1 UFC/55 gr.

Estos cálculos de probabilidad no dependen del tamaño del lote, ya que se basan en la proporción de unidades defectuosas del lote y no en su número absoluto. Sin embargo, las consecuencias derivadas de la aceptación de lotes contaminados serán diferentes según el número de unidades de los lotes: como más unidades tenga el lote, más unidades contaminadas se entregarán en el circuito comercial.

En definitiva, a causa de las limitaciones estadísticas de los planes de muestreo, el análisis del producto final no garantiza, por sí sola, la seguridad del producto. La obtención de resultados conformes a los criterios microbiológicos podría dar una falsa sensación de seguridad,⁹⁶ que se agrava si no se respetan los mínimos legalmente establecidos y se reduce el número de unidades que se han analizar. El adecuado nivel de seguridad alimentaria se alcanza, primeramente, por medio de medidas preventivas y proactivas, aplicadas en todas y cada una de las fases de producción, distribución, conservación, venta y consumo de los alimentos.

Anexo 2. Control ambiental. Muestreo de superficies, recomendaciones

Dada la ubicuidad y capacidad de persistencia que caracteriza *L. monocytogenes* en el ámbito de la industria y los establecimientos de elaboración de los alimentos, las fuentes de contaminación directas e indirectas de éste patógeno son muy variadas.

En el marco de la vigilancia y control de *L. monocytogenes*, el control ambiental por medio del muestreo de superficies, especialmente las que entran en contacto directo con los alimentos listos para el consumo, se considera más importante que el análisis del producto final.^{72, 113} El objetivo del muestreo ambiental es la detección y eliminación de cepas persistentes o, en caso de que la eliminación no sea posible, implementar acciones correctoras en el marco del APPCC para evitar la contaminación de los alimentos.⁹

Los controles microbiológicos ordinarios (p. ej. ISO 18593) antes de la puesta en marcha de la producción, o los protocolos para evaluar la eficacia de la limpieza y la desinfección, no son adecuados para detectar nichos de contaminación de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, es necesario diseñar un programa específico para el muestreo ambiental, además de las acciones necesarias que se tienen que emprender tan rápidamente y efectivamente como sea posible ante un resultado positivo.¹⁴³ Aunque en Europa,⁴¹ los EEUU,⁷² el Canadá^{39, 85} y Australia¹⁴ es obligatorio realizar el muestreo ambiental desde hace años, no hay ninguno un protocolo estándar común para hacerlo ni para interpretar los resultados.

No obstante, desde el Laboratorio de Referencia para *L. monocytogenes* de la Unión Europea (EURL Lm) ubicado en la Agencia Francesa de Seguridad Alimenticia, Ambiental y Salud Ocupacional (ASAS), y con la participación de diversos estados miembros, se elaboraron directrices para el muestreo de áreas de procesamiento de alimentos y equipamientos para la detección de *L. monocytogenes*.⁹ Estas directrices complementan el protocolo ISO18593 citado en el Reglamento (CE) 2073/2005 (artículo 5)⁴¹ y describen pautas sobre dónde, cómo y en qué momento hay que muestrear. Sin embargo, no se dan indicaciones sobre la frecuencia, el número ni las rotaciones de puntos de muestreo, entre otros aspectos, ya que se considera que hay que diseñarlos en cada caso según el riesgo asociado a cada tipo de producto, proceso productivo y productor.

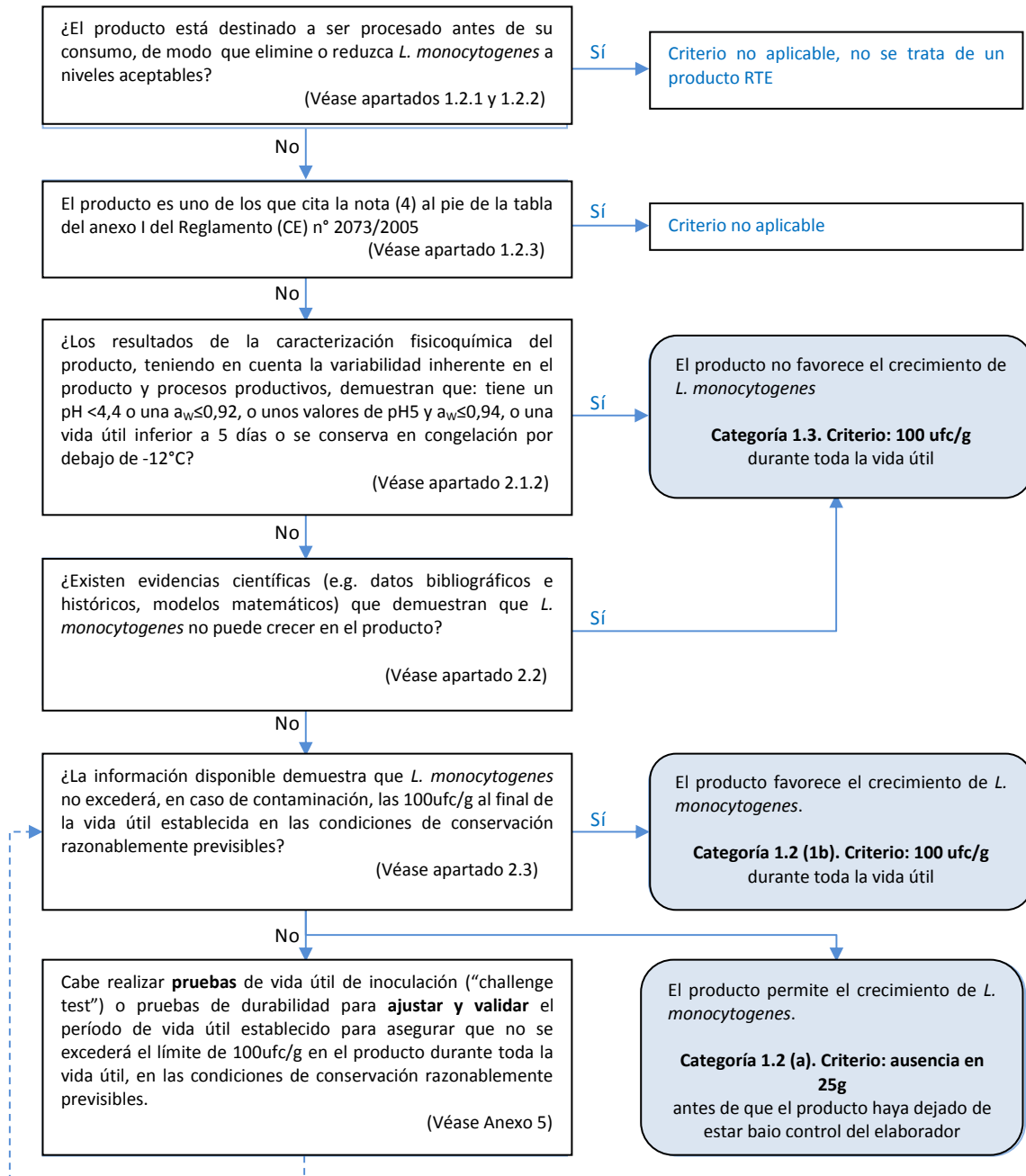
En la [Tabla 12](#) se esquematizan los aspectos más relevantes del control de la contaminación ambiental y las recomendaciones que da la guía para el muestreo de áreas y equipamientos utilizados para la producción de alimentos listos para el consumo.⁹

Tabla 12. Resumen de las recomendaciones para el muestreo de áreas y equipamientos usados para la producción de alimentos listos para el consumo (RTE), descritas en la guía elaborada por el Laboratorio de Referencia para *L. monocytogenes* de la Unión Europea (EURL Lm).⁹

Muestreo	Breve descripción
DONDE	<p>Selección de los lugares de muestreo</p> <p>Según el historial de cada empresa y el proceso productivo. Debe incluir:</p> <ul style="list-style-type: none"> - superficies de contacto con alimentos RTE (más frecuencia), - superficies de no-contacto con alimentos RTE, - ambiente (más ocasional).
CUANDO	<p>Momento de realizar el muestreo</p> <p>Nunca inmediatamente después de la limpieza y desinfección. Para incrementar la probabilidad de detectar una cepa persistente es recomendable:</p> <ul style="list-style-type: none"> - durante el procesamiento, - después de un mínimo 2 h de producción, - final de la tanda de producción. <p>Muestreo diario o bien rotativo (no siempre el mismo día de la semana)</p>
COMO	<p>Dispositivo para la toma de muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gasa/toallita/esponja o bien escobillón (para áreas pequeñas o de difícil acceso) - Seco (para áreas húmedas) o bien húmedo (para áreas secas) <p>Diluyente</p> <p>Soluciones estériles sin neutralizante, excepto si se espera la presencia de residuos de desinfectantes (p. ex. después de la limpieza y la desinfección)</p> <p>Área</p> <p>Tan extensa como sea posible (es recomendable entre 1.000 y 3.000 cm²).</p> <p>Se ha de evitar el uso de plantillas que pudieran contribuir a diseminar la contaminación.</p>

Anexo 3. Árbol de decisión sobre la aplicación de los criterios microbiológicos

Árbol de decisión para ayudar a aplicar correctamente los criterios microbiológicos (adaptado de las referencias 37 y 67).



Anexo 4. Características del crecimiento bacteriano

Generalmente, cuando una bacteria llega a un determinado medio (o alimento) y halla las condiciones favorables, se desarrolla y a menudo lo hace en cuatro fases diferenciadas (Figura 17).

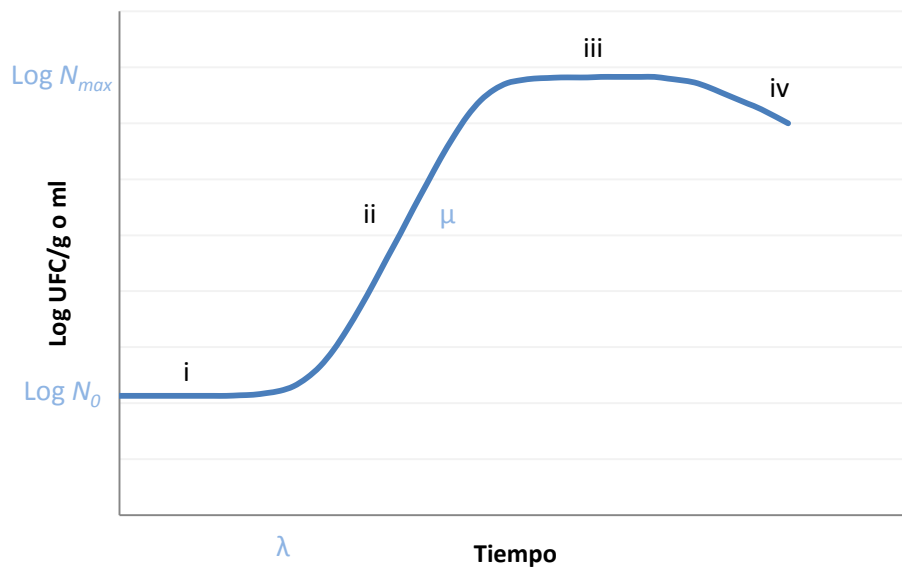


Figura 17. Fases de la curva de crecimiento bacteriano: latencia (i), exponencial (ii), estacionaria (iii) y muerte (iv).

- (i) La fase de **latencia** (λ o *lag*, caracterizada por el parámetro λ), en la cual la bacteria no se divide, pero es metabólicamente activa, se adapta al medio y se prepara para dividirse. Las características implícitas de la cepa bacteriana (capacidad para adaptarse), su estado fisiológico y los factores ambientales (intrínsecos y extrínsecos) determinan la duración de esta fase de adaptación.
- (ii) La fase **exponencial**, en la que el número de células bacterianas aumenta exponencialmente como consecuencia de la división binaria. El tiempo de duplicación celular (o tiempo de generación) es constante para una misma cepa bacteriana cuando se encuentra en determinadas condiciones ambientales constantes y depende de las características implícitas (p. ej. los determinantes genéticos), pero no del estado fisiológico previo. El tiempo de generación es inversamente proporcional a la máxima velocidad o tasa específica de crecimiento exponencial (μ).

-
- (iii) La **fase estacionaria** aparece en el momento en que la tasa de división celular se iguala con la tasa de muerte celular. En la práctica, se observa que la concentración bacteriana se estabiliza (deja de aumentar) y sucede cuando el principal sustrato energético y/o nutritivo se agota y/o cuando se acumulan metabolitos tóxicos para la bacteria. En los alimentos, esta fase suele aparecer cuando la concentración bacteriana ($N_{m\acute{a}x}$) (alcanza las 10⁶ 10⁹ UFC/gr. Sin embargo, la máxima densidad de población puede ser menor, dependiendo de los factores ambientales y las posibles interacciones con otros grupos bacterianos.
- (iv) La **fase de muerte** aparece porque la tasa de muerte supera la tasa de división celular, lo cual hace que disminuya la concentración de células viables.

Anexo 5. Establecimiento y validación de la vida útil segura

El establecimiento de la vida útil segura de los alimentos (entendida como la fecha de caducidad) constituye una medida de control que hay que validar como aparte del sistema de gestión de riesgos asociados a los alimentos (ved el apartado 2.1.3).

Los estudios para determinar y validar la vida útil segura de los alimentos incluyen diversos aspectos complementarios (Figura 18) que, de hecho, se tratan en el anexo II del Reglamento (CE) 2073/2005.

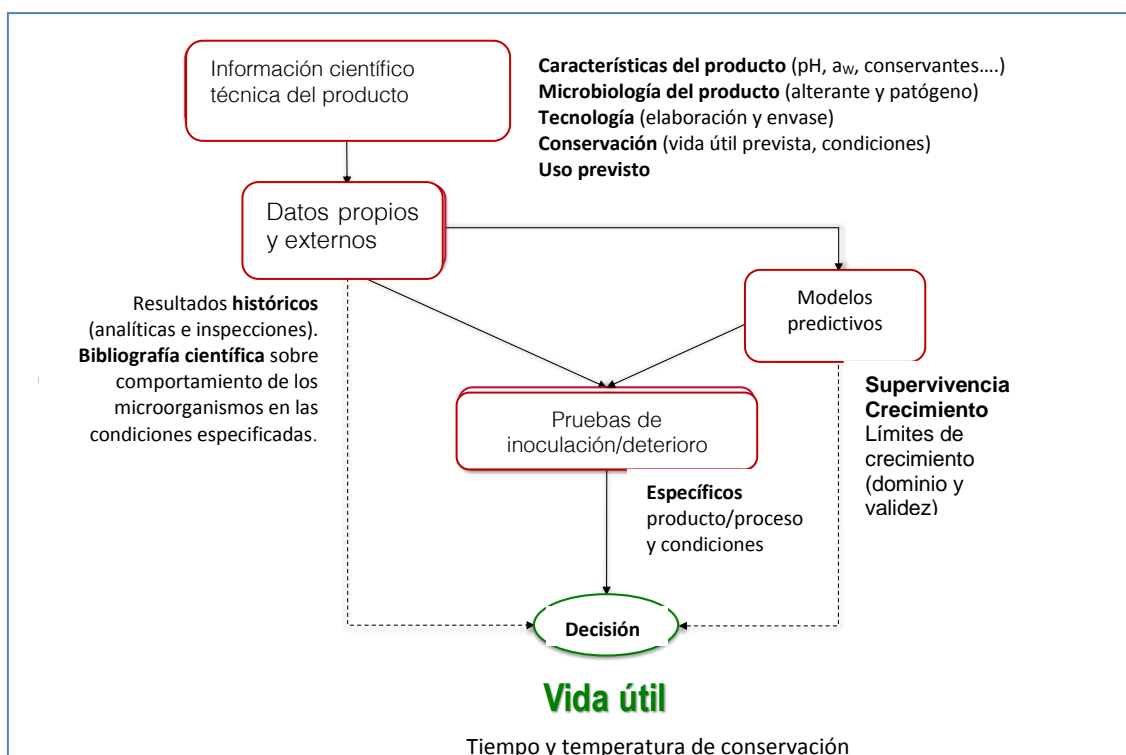


Figura 18. Procedimientos para la determinación y validación de la vida útil segura dels aliments.

En términos generales, los estudios de vida útil requieren primeramente una caracterización exhaustiva del alimento en relación con las especificaciones técnicas del producto y de los procesos productivos,

- los factores intrínsecos (características fisicoquímicas del producto final, contenido de sal, de agua, concentración de conservantes, etc.),
- los factores extrínsecos (tipo de envase, temperatura de conservación hasta el momento del consumo, tiempo de vida útil prevista) y
- la probabilidad y niveles de contaminación.

Esta caracterización tiene que tener en cuenta la variabilidad inherente del producto, además de los procesos productivos y las condiciones de conservación y uso razonablemente previsibles.

A partir de la información recogida se **caracteriza el comportamiento del microorganismo o microorganismos patógenos** relevantes para el tipo de alimento, en función de las condiciones representativas del alimento en cuestión. Se trata de dilucidar si el patógeno podrá crecer en el alimento o no y, en caso afirmativo, determinar el tiempo que, en caso de una hipotética contaminación a niveles razonablemente posibles, tardaría en alcanzar el límite crítico (p. ej. 100 UFC/g para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo no destinados a población de riesgo).

Esta fase se puede realizar a partir de:

- datos disponibles en la literatura científica o en bases de datos especializados (véase el apartado 2.2.1),
- la aplicación de modelos predictivos que prevean los factores relevantes para el producto estudiado (véase los apartados 2.2.2 y 2.3.1),
- pruebas de laboratorio específicas, como pruebas de inoculación (*challenge test*, a partir de productos contaminados deliberadamente) o las pruebas de durabilidad (a partir de productos contaminados naturalmente) (véase los apartados 2.2.3 y 2.3.2). Hay guías de ámbito europeo que se han elaborado para apoyar la realización de las pruebas de laboratorio diseñados específicamente para determinar la vida útil segura en productos listos para el consumo según el Reglamento (CE) 2073/2005.^{43, 59}

Son diversos los documentos técnicos y las directrices generales publicados por diferentes organismos e instituciones internacionales en relación con los estudios de vida útil de los alimentos.^{5, 20, 62, 86, 98, 119, 122, 125, 135, 137, 154} En cualquier caso, hay que remarcar el hecho que la aplicación de las diferentes herramientas descritas en el presente documento y en las directrices mencionadas, pero sobre todo la interpretación de los resultados obtenidos en los estudios de vida útil, requieren experiencia y conocimientos de las posibilidades, condicionantes y limitaciones de los procedimientos aplicados.