

# 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

## Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, M<sup>a</sup> Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M<sup>a</sup> Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas-Salvadó, M<sup>a</sup> Carmen Vidal Carou.

## Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-003

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011

## Grupo de Trabajo

Antonio Martínez López (Coordinador)  
Alberto Cepeda Sáez  
Antonio Herrera Marteache  
Cristina Alonso Andicoberry (AESAN)

## Resumen

El Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios establece que, en alimentos listos para el consumo (LPC) que pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, el límite para este microorganismo es de ausencia en 25 g. Únicamente se establece un límite de 100 ufc/g en alimentos LPC no destinados a lactantes o a usos médicos especiales si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que no se superará este límite durante toda la vida útil del producto.

Cuando sea necesario, las industrias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II del Reglamento, especialmente en los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria. La evidencia de que no se supera el límite de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* para cada producto a lo largo de su periodo de uso se debe basar en estudios de vida útil, que consistirán inicialmente en la información sobre la composición específica del alimento en cuestión (características intrínsecas y extrínsecas) y comparación con datos procedentes de la literatura científica relevante relativa a las características de crecimiento y supervivencia del microorganismo patógeno en cuestión. El histórico de datos de productos fabricados, la microbiología predictiva y los estudios de vida útil específicos en laboratorio (estudios de durabilidad y ensayos de desafío) son herramientas adicionales que se utilizarán en caso de que los estudios de composición del alimento y condiciones de proceso y comparación con datos publicados en revistas científicas proporcionen dudas respecto a la posibilidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. No obstante, los ensayos de desafío de alimentos deben evitarse siempre que sea posible y usarse con gran cautela. Se recomienda la consulta con una entidad competente antes de su uso. Se recomienda que la industria sólo realice ensayos de desafío si tiene los medios apropiados, conocimiento, entrenamiento

y experiencia con estas técnicas microbiológicas. En este documento se dan pautas para la aplicación de lo dispuesto en el anexo II del Reglamento (búsqueda de información y estudios complementarios que permitan establecer la vida útil de los alimentos), de forma que ayude al fabricante a escoger la mejor manera de determinar la vida útil de los alimentos que produce y a las autoridades competentes a verificar, cuando sea oportuno, que el fabricante del producto demuestra que no superará el límite de 100 ufc/g durante la vida útil del producto.

### Palabras clave

*Listeria monocytogenes*, vida útil, estudios de desafío, estudios de durabilidad, alimentos listos para su consumo.

### Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in certain foodstuffs.

### Abstract

Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs establishes that, in ready-to-eat foods that may enhance the growth of *Listeria monocytogenes*, the limit for this microorganism is absence in 25 g. A limit of 100 ufc/g is established solely in ready-to-eat foods not intended for infants or for special medical purposes, provided that the manufacturer is able to demonstrate to the satisfaction of the competent authority, that this limit will not be exceeded throughout the entire shelf-life of the product.

Where necessary, the industries responsible for the manufacture of the product shall carry out studies in accordance with that established in annex II of the Regulation, especially in ready-to-eat food that may permit the development of *Listeria monocytogenes* and could suppose a risk to public health with respect to said bacteria. Evidence that the limit of 100 ufc/g of *Listeria monocytogenes* for each product is not exceeded throughout the product's shelf-life, initially consists in the information about the specific composition of the foodstuff in question (intrinsic and extrinsic characteristics) and comparison with data taken from relevant scientific literature relating to the characteristics of growth and survival of the pathogenic microorganism in question. The historical data of the manufactured products, the predictive microbiology and the specific shelf-life studies in the laboratory (durability studies and challenge tests) are additional tools used in the event that the studies of the food composition and processing conditions and comparison of data published in scientific journals offer doubts as to the growth possibilities of *Listeria monocytogenes*. However, food challenge tests should always be avoided wherever possible and used with great caution. We recommend consultation with a competent body prior to use. The industry should only perform challenge tests if they possess the appropriate means, knowledge, training and experience in these microbiological techniques. This document offers guidelines on the application of that established in annex II of the Regulation (search for information and complementary studies that permit the definition of the shelf-life of foodstuffs), in order to assist the manufacturer in selecting the best way of determining the shelf-life of the foods

they produce, and the competent authorities to check, as appropriate, that the product manufacturer proves that the limit of 100 ufc/g is not exceeded during the product's shelf-life.

### **Key words**

*Listeria monocytogenes*, shelf-life, challenge test, durability studies, ready to eat foods.

## Introducción

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo que se ha convertido en uno de los principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos listos para su consumo (LPC) que afectan a poblaciones de riesgo. La *Listeria monocytogenes* tiene características únicas y específicas (FSAI, 2005b) (Luber et al., 2011). Se desarrolla adecuadamente a temperaturas de refrigeración con un mínimo entre 1,5 y 3 °C y un máximo de 45 °C, esta capacidad le permite mantener la viabilidad en el interior o en las superficies de los alimentos que generalmente se conservan a bajas temperaturas. Se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente, es altamente contaminante en las plantas procesadoras de alimentos, llegando a contaminar las superficies de contacto de los alimentos incluido el producto mismo. Esta bacteria puede ingresar a las plantas de alimentos mediante la tierra proveniente de los zapatos y la vestimenta del personal que trabaja en la fábrica, así como en el transporte utilizado, por medio de animales que excreten la bacteria o que tengan la piel contaminada y mediante vegetales crudos contaminados. Todo ello hace que la *Listeria monocytogenes* sea un problema importante en la producción de alimentos. Esto es especialmente cierto en el caso de los alimentos listos para su consumo (alimento para el consumo humano directo sin la necesidad de cocinar u otro proceso eficaz para eliminar o reducir la concentración de un microorganismo de interés en salud pública a un nivel aceptable) (LPC) en los que la *Listeria monocytogenes* puede crecer y que no van a recibir un tratamiento térmico durante la producción y para aquellos alimentos que se pueden contaminar a través del medio ambiente industrial (UE, 2008).

Es crucial que los productores de alimentos listos para su consumo lleven a cabo las acciones oportunas para controlar la contaminación por *Listeria monocytogenes*, así como su crecimiento en el producto hasta el fin de su vida útil. Se necesita por tanto disponer de información y documentación sobre el crecimiento potencial en un alimento y debe tenerse en cuenta cuando el productor calcula el tiempo de vida útil para el producto (UE, 2008).

El 15 de noviembre de 2005, la Comisión Europea publicó el Reglamento (CE) N° 2073/2005 (UE, 2005), relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, entre los que se encuentran los alimentos listos para su consumo y *Listeria monocytogenes*.

El artículo 3 del citado Reglamento indica que los explotadores de las empresas alimentarias velarán por que los productos alimenticios cumplan con los límites de los criterios microbiológicos pertinentes establecidos en el mismo Reglamento. Además, el artículo 3 se refiere a los estudios (relacionados en el anexo II del Reglamento) que el explotador de la empresa alimentaria puede llevar a cabo, cuando sea necesario, con objeto de investigar si se cumple con el criterio a lo largo de la vida útil. En particular, esto se aplica a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria.

En 2008, se difundió el informe SANCO/1628/2008 ver. 9.3 (26112008) (UE, 2008) que es una guía sobre estudios de vida útil en alimentos listos para su consumo en relación a la presencia de *Listeria monocytogenes*, bajo el Reglamento (CE) N° 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, sobre criterios microbiológicos en alimentos y dirigida a los operadores económicos de las industrias alimentarias. No obstante este documento, no describe con detalle la forma de llevar a cabo un estudio de vida útil para un alimento en particular e indica que puede complementarse con directrices más detalladas

realizadas por institutos, autoridades nacionales y la industria alimentaria. Como consecuencia, el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para *Listeria monocytogenes* preparó un documento técnico separado dirigido a los laboratorios que llevan a cabo estudios de vida útil, especialmente estudios de durabilidad y test de desafío (AFSSA, 2008).

Igualmente algunas asociaciones sectoriales de industrias alimentarias (*Chilled Food Association Ltd*) o Agencias de Seguridad Alimentaria (*Food Safety Authority of Ireland*) han preparado documentos o guías dirigidas a las industrias como ayuda para llevar a cabo esos estudios de vida útil en alimentos listos para su consumo (LPC) para *Listeria monocytogenes*, ya que al parecer hay una cierta confusión en los distintos sectores industriales en relación a cómo se deben llevar a cabo estos estudios para sus propios productos de forma que los resultados de los mismos tengan la base científica y estadística necesaria para que sean aceptados por las autoridades sanitarias.

Para clarificar la situación se solicita un informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los modelos aplicables a los estudios de vida útil en alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

**Términos de referencia:** Se requiere que el Comité Científico lleve a cabo una valoración y comparación de los modelos aplicables a los estudios de vida útil de alimentos listos para el consumo que puedan favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

Este informe ayudaría a los productores a diseñar los estudios de vida útil de sus productos y podría constituir una guía de apoyo para las autoridades competentes que, de forma voluntaria, quieran hacer uso de este documento para valorar, cuando proceda, el cumplimiento de los criterios microbiológicos establecidos para *Listeria monocytogenes* en el Reglamento (CE) N° 2073/2005.

## Reglamento

El artículo 3, apartado 2 del Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, establece que, cuando sea necesario, los explotadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil del alimento en cuestión. Esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria. Las empresas alimentarias podrán colaborar en la realización de dichos estudios.

Los estudios a los que se refiere el artículo 3, apartado 2, consistirán en lo siguiente:

- especificaciones de las características fisicoquímicas del producto, como pH,  $a_w$ , contenido de sal, concentración de conservantes y tipo de sistema de envasado, teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento y transformación, las posibilidades de contaminación y la vida útil prevista, y
- la consulta de la bibliografía científica y de los datos de investigación disponibles acerca de los aspectos que caracterizan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en cuestión en relación a dichas características.

Cuando sea necesario, basándose en los estudios antes mencionados, el explotador de la empresa alimentaria realizará estudios complementarios, entre los que pueden incluirse los siguientes:

- elaboración de modelos matemáticos de pronóstico establecidos para el alimento de que se trate, utilizando factores críticos de crecimiento o supervivencia aplicables a los microorganismos en cuestión presentes en el producto,
- pruebas para investigar la capacidad que tiene el microorganismo en cuestión, adecuadamente inoculado, para crecer o sobrevivir en el producto en diferentes condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles,
- estudios para evaluar el crecimiento o supervivencia de los microorganismos en cuestión que puedan estar presentes en el producto durante su vida útil en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización.

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

### Propósito y alcance del documento

El propósito de este documento es dar pautas para la aplicación de lo dispuesto en el anexo II del Reglamento (CE) Nº 2073/2005 sobre criterios microbiológicos en alimentos.

Puesto que el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para *Listeria monocytogenes* ha publicado una guía muy completa sobre metodología para llevar a cabo los ensayos de desafío y los estudios de durabilidad, el alcance de este documento se limita a establecer unos criterios que permitan al fabricante de alimentos elegir la metodología más adecuada en cada caso particular (alimento o formulación) de forma que los resultados obtenidos permitan su evaluación por parte de las autoridades competentes para comprobar si se garantiza convenientemente la inocuidad de los productos de acuerdo con la reglamentación sobre criterios microbiológicos aplicable en este caso.

### Herramientas para establecer la vida útil

#### 1. Introducción

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 establece tres tipos de alimentos listos para su consumo (LPC) en lo que se refiere al control de *Listeria monocytogenes*.

En un primer grupo aparecen los alimentos LPC para lactantes y alimentos para el consumo destinados a usos médicos especiales en los que *L. monocytogenes* debe estar ausente en los productos comercializados (ausencia en 25 gramos de producto tras el análisis de diez muestras).

En un segundo grupo se incluyen los alimentos LPC que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* y en los que se debe garantizar que a lo largo de la vida útil la concentración de *L. monocytogenes* no supere 100 ufc/g (análisis de cinco muestras,  $c=0$ ) o que antes de dejar el control de la fabricación la concentración de *Listeria* sea de ausencia en 25 gramos (análisis de cinco muestras,  $c=0$ ) cuando el explotador no pueda demostrar que el producto no superará los 100 ufc/g.

El tercer grupo se corresponde con aquellos alimentos que no favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes* o que tienen un vida útil inferior a los cinco días, en los que el límite se establece en las 100 ufc/g tras el análisis de cinco muestras.

Las evidencias relacionadas con estas exigencias se deben basar en estudios de vida útil, que

consistirán inicialmente en conseguir la información necesaria sobre la composición del alimento en cuestión (características químicas y físicas, por ejemplo) y examen de la literatura científica relevante en relación a dicha composición. Si el resultado de estos estudios dan la seguridad necesaria para decir que la *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento, no es necesario seguir con estudios posteriores. Sin embargo, si los resultados arrojan dudas respecto a la posibilidad de crecimiento del microorganismo, entonces es necesario llevar a cabo una serie de estudios adicionales que pueden incluir uno o más de los siguientes (CFA, 2010):

- Histórico de datos de productos fabricados.
- Microbiología predictiva.
- Estudios de vida útil específicos en laboratorio (estudios de durabilidad, ensayos de desafío).

La vida útil se define como un periodo de tiempo durante el cual el alimento permanece inocuo y cumple con sus especificaciones de calidad durante su almacenamiento y uso esperado. La vida útil indica la fecha de duración y se expresa en el producto como "usar hasta" una determinada fecha o "consumir preferentemente antes" de una determinada fecha, tal como describe el artículo 11 del Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.

Los estudios de vida útil se deben llevar a cabo en las siguientes circunstancias (UE, 2008):

- Desarrollo de nuevos productos o modificación de los existentes llevados a cabo por las industrias.
- Desarrollo de nuevos procesos o modificaciones llevados a cabo por las industrias.
- Desarrollo de nuevos envases y procedimientos de envasado llevado a cabo por las industrias.
- Cualquier cambio significativo en los ingredientes y en el envasado de un producto existente.
- Cambios de lugar de producción o equipo de producción.
- Cuando no hay estudios previos de vida útil.

## **2. Información proporcionada por las características del producto y literatura científica**

### **Características del producto**

Los estudios de vida útil deberán incluir siempre información sobre la composición específica del alimento objeto del estudio y comparación con la literatura científica relevante relativa a las características de crecimiento y supervivencia del microorganismo patógeno en cuestión (FSAI, 2005a).

Las características intrínsecas del producto tales como pH,  $a_w$  (actividad de agua) concentración de sal así como la concentración de conservantes y las extrínsecas, afectan a la supervivencia y crecimiento de la *Listeria monocytogenes* en el alimento y marcan la forma en que el alimento debe ser envasado y el tiempo y temperatura de almacenamiento. Por consiguiente, se deben determinar con claridad estas características fisicoquímicas. Esta determinación se debe hacer en las condiciones normales de elaboración, envasado y almacenamiento del producto, teniendo en cuenta la posibilidad de recontaminación y la vida útil prevista para el mismo. La Tabla 1 muestra algunas características intrínsecas y extrínsecas que se deben tener en cuenta en estudios de vida útil.

<b>Características intrínsecas</b>	<b>Características extrínsecas</b>
Calidad microbiológica de materias primas	Buenas prácticas higiénicas y de fabricación
Histórico de las materias primas	APPCC <sup>1</sup>
Composición y formulación del alimento	Procesado de alimentos
Estructura y ensamblado del alimento	Temperatura de almacenamiento
pH	Composición de gases
Tipo de ácido presente	Humedad relativa
Actividad de agua ( $a_w$ )	Envasado
Potencial Redox (Eh)	Prácticas en venta al por menor
Estructuras biológicas	Prácticas del consumidor
Disponibilidad de oxígeno	–
Contenido nutricional y disponibilidad	–
Constituyentes antimicrobianos	–
Microbiota natural o artificial presente en el alimento	–

<sup>1</sup>APPCC: Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos. **Adaptada de** (Jay, 1992) (Mc Donald, 1999).

Si no hay experiencia en la empresa para llevar a cabo estas determinaciones, se recomienda acudir a un centro de investigación o laboratorio especializado que ayude al procesador de alimentos a entender y conseguir la información necesaria (CFA, 2010).

Determinar las características del alimento permitirá averiguar si *Listeria monocytogenes* puede o no crecer en dicho alimento. De acuerdo a la información publicada en el Reglamento sobre criterios microbiológicos (UE, 2005), se puede considerar que un alimento no permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes* si tiene las siguientes características intrínsecas:

- pH es igual o menor a 4,4.
- $a_w$  es menor o igual a 0,92.
- pH es menor o igual a 5,0 con una  $a_w$  menor o igual a 0,94.

No obstante en otros documentos y guías, se consideran valores de pH menores o iguales a 4,2 o 4,3 y actividades de agua menores o iguales a 0,90 como las condiciones bajo las cuales, *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento (FSAI, 2003) (UE, 2004) (UE, 2008) (CFA, 2010) . Estas condiciones intrínsecas son algo más restrictivas que las publicadas en el Reglamento sobre criterios microbiológicos (UE, 2005).

Si estos parámetros se utilizan para demostrar que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en ese alimento, entonces se deberían considerar como límites críticos a controlar como parte del sistema APPCC y no se necesitarán estudios posteriores de vida útil en relación a *Listeria monocytogenes*. Si hay una evidencia científica de que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento debido a sus características fisicoquímicas (intrínsecas) se debe aplicar el límite de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* a lo largo de la vida útil del alimento tal como indica la legislación.

### **Bibliografía científica**

Actualmente existe una amplia cantidad de datos sobre *Listeria monocytogenes* en libros, publicaciones científicas, universidades y centros de investigación públicos y privados. También hay datos disponibles



en las distintas agencias nacionales, europeas o internacionales (por ejemplo, *European Food Safety Authority*).

Cuando el operador de alimentos ha establecido las características de su producto y las condiciones bajo las cuales el producto será envasado y almacenado, debe compararlas con las que existen en la literatura científica respecto a la capacidad de supervivencia o crecimiento de *Listeria monocytogenes* o cualquier otro microorganismo patógeno. La Tabla 2 muestra algunos factores que limitan la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

**Tabla 2.** Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*

Factor	Puede crecer			Puede sobrevivir, pero no crecer
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1,5 a +3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
Actividad de agua (a <sub>w</sub> )	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentración de sal (%)	<0,5	0,7	12 a 16	≥20
Atmósfera	Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo, envasado a vacío o atmósfera modificada			

Adaptada de (FSAI, 2003) (UE, 2004, 2008).

### 3. Estudios complementarios

Si la comparación de las características del producto con la literatura científica relevante u otros datos, no permite tener garantías de que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento, entonces es necesario llevar a cabo estudios adicionales que pueden incluir análisis y uso del histórico de datos, uso de microbiología predictiva o estudios de durabilidad o ensayos de desafío. Todos estos estudios deben tener en cuenta la variabilidad inherente unida a los alimentos, al microorganismo en cuestión y a las condiciones de almacenamiento y procesado.

#### Histórico de datos

Todas las empresas deben mantener registros incluyendo aquellos sobre la inocuidad de alimentos que se encuentran ya en el mercado. Esta información se denomina histórico de datos y corresponde a los registros específicos de los lugares de producción y alimentos, que se van acumulando a lo largo del tiempo.

Estos datos (incluyendo las comprobaciones en el producto final en el mismo día de la producción y final de la vida útil) se pueden usar como evidencia de que la concentración de *Listeria monocytogenes* en el alimento no excede el límite de 100 ufc/g. Los datos sobre los niveles de *Listeria monocytogenes* en alimentos LPC ya existentes se pueden usar para evaluar la posibilidad de crecimiento potencial y confirmar que la vida útil asignada al alimento es apropiada. También se pueden aplicar a alimentos LPC similares con características intrínsecas comparables, elaborados bajo prácticamente las mismas condiciones de proceso.

Los datos a utilizar deben ser (CFA, 2010):

- Aquellos provenientes del APPCC y controles de seguimiento y deben incluir lo siguiente:
  - Validación de procesos, verificación y seguimiento (temperatura, pH,  $a_w$ ).
  - Trazabilidad de ingredientes y comprobación de la calidad microbiológica.
  - Muestreo de especies de *Listeria* (incluidas las no patógenas) y de organismos indicadores de higiene apropiados en las distintas áreas de la industria procesadora y del equipo.
  - Comprobación de presencia y concentración de *Listeria monocytogenes* en el producto acabado, por ejemplo en el mismo día de producción y al final de la vida útil, con ello se verifica el funcionamiento efectivo del APPCC y se verifica la durabilidad.
- Aquellos provenientes de la evaluación de la vida útil.

El nivel de confianza incrementa con la cantidad de datos disponibles en la empresa, por tanto cuantas mas unidades de producto se comprueben mayor será la fiabilidad del histórico de datos (UE, 2008). No obstante, no es posible recomendar una cantidad específica de datos ya que esta es una aproximación basada en el riesgo y depende de variaciones en el proceso de elaboración y naturaleza del alimento (CFA, 2010).

### Microbiología predictiva

La microbiología predictiva puede ser una herramienta a tener en cuenta cuando es necesario llevar a cabo estudios adicionales para confirmar la vida útil que se ha establecido para un alimento.

La microbiología predictiva tiene como objeto predecir el comportamiento de los microorganismos en los alimentos durante su producción o almacenamiento. En los últimos años se han producido avances significativos en este campo especialmente para estimar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos. De hecho, el programa de predicción de crecimiento microbiano *Combase* (2010) es una fuente disponible para todas las empresas y puede ayudar en la determinación del crecimiento. También hay varias herramientas que se pueden combinar con el *Combase* para ayudar a las pequeñas empresas en la determinación de los controles de su proceso (Dalgaard, 2009). Otros programas de interés son el *Growth Predictor* que se puede obtener de forma gratuita en la siguiente dirección: [www.lfr.ac.uk/safety/growthpredictor](http://www.lfr.ac.uk/safety/growthpredictor) y *Pathogen Modelling Programme* que igualmente se puede obtener de forma gratuita en la siguiente dirección: <http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6786>.

En general, introduciendo factores intrínsecos clave del alimento (pH,  $a_w$  o concentración de sal), y datos del proceso a un modelo microbiológico predictivo (programa de ordenador) es posible obtener una indicación del crecimiento potencial de un determinado microorganismo para el cual se desarrolló el modelo. No obstante, conviene señalar que los datos para construir modelos matemáticos se suelen obtener en experimentos llevados a cabo en el laboratorio, por consiguiente los modelos se deben validar frente a datos de supervivencia y crecimiento obtenidos en el propio alimento antes de su utilización.

Los modelos matemáticos predictivos pueden ser útiles en las siguientes aplicaciones (UE, 2008):

- Para predecir el crecimiento bacteriano en varias condiciones.
- Para predecir la probabilidad de crecimiento de los microorganismos en los alimentos.

- Para estimar el nivel de contaminación en un momento dado de la vida útil.
- Para estimar la variabilidad entre dos lotes.
- Para optimizar la formulación del alimento asegurando la mayor estabilidad.
- Para evaluar el impacto de la rotura de la cadena de frío y ensayar diferentes condiciones de almacenamiento.
- Para ayudar en la identificación de Puntos Críticos de Control en un proceso.

En relación al uso de los modelos matemáticos hay que tener en cuenta que muchos de ellos se han obtenido en medios líquidos, la mayoría de ellos homogéneos, con el fin de determinar el impacto de determinados factores medioambientales sobre los microorganismos. En estos casos puede que el modelo no haga buenas predicciones describiendo el comportamiento de los microorganismos en los alimentos, aunque el modelo haya sido validado en el alimento. Otros modelos se han obtenido en los propios alimentos y pueden describir con bastante exactitud el comportamiento del microorganismo en un alimento específico durante el almacenamiento, sin embargo puede ser cuestionable la descripción del impacto de la variabilidad de las características fisicoquímicas del alimento o hacer predicciones para otros alimentos distintos al original.

Hay ocasiones en que las predicciones no son exactas debido a respuestas inconsistentes de los microorganismos o ligeras variaciones en el medio de cultivo. Algunas investigaciones han demostrado que estas son las razones que hay detrás de la falta de exactitud de algunos modelos predictivos en la predicción de la supervivencia y crecimiento de los microorganismos (FDA, 2001).

En conclusión, aunque los modelos matemáticos predictivos proporcionan un medio poco costoso para minimizar el muestreo microbiológico en estudios de vida útil, se deben usar con precaución y solo por personal entrenado, con experiencia y conociendo las limitaciones y las condiciones de uso.

### **Estudios de laboratorio específicos para vida útil**

Adicionalmente se pueden llevar a cabo estudios específicos en el laboratorio para determinar el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Estos estudios se conocen como ensayos de desafío (inoculación experimental del alimento) y estudios de durabilidad.

### **Ensayos de desafío**

En general, estos ensayos solo se usan cuando otros métodos de evaluación de la inocuidad o estabilidad del alimento no se pueden llevar a cabo o no dejan suficientemente claro que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento o existen dudas sobre la idoneidad de la vida útil establecida para dicho alimento. Los ensayos de desafío proporcionan información sobre el comportamiento de los microorganismos (*Listeria monocytogenes*) inoculados en el alimento, antes de su almacenamiento, bajo unas condiciones medioambientales determinadas en un ambiente de laboratorio (Betts, 2010). La Unión Europea estableció protocolos para llevar a cabo los ensayos de desafío (UE, 2008). En esencia consisten en inocular el alimento con una concentración definida de una mezcla de cepas de *Listeria monocytogenes* y medir los cambios en las tasas poblacionales del microorganismo durante el almacenamiento considerando el caso más desfavorable. Este tipo de ensayo debe tener en cuenta

la variabilidad en los alimentos (uso de diferentes lotes) y la contaminación específica del alimento (inoculación de cepas aisladas del alimento). No obstante, es difícil mimetizar el nivel de contaminación, la heterogeneidad de la contaminación y el estado fisiológico de las bacterias (AFSSA, 2008).

Los ensayos de desafío o inoculación experimental, sirven para evaluar el potencial de crecimiento de un microorganismo, es decir si puede o no crecer en un alimento específico ( $\delta$ ) o estimar parámetros de crecimiento como la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ).

Los estudios deben simular un abuso razonable de temperatura durante la venta al por menor y durante el almacenamiento del alimento listo para su consumo (LPC) por el consumidor (Scott et al., 2005).

Es aconsejable utilizar inóculos con baja concentración de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* con objeto de introducir la variabilidad en los resultados (Metris et al., 2008). Las cepas usadas deben ser las típicas encontradas en el producto a evaluar pero también debe incluirse cepas clínicas y aquellas que son resistentes al estrés medioambiental durante la vida útil del producto (Luber et al., 2011).

#### *Estudios para establecer el potencial de crecimiento*

Un ensayo de desafío (inoculación experimental) para evaluar el potencial de crecimiento, consiste en un estudio de laboratorio en el que se inocular artificialmente *Listeria monocytogenes* en el alimento y se mide su crecimiento durante el almacenamiento en las condiciones de transporte distribución y almacenamiento previsibles. Las condiciones deben ser realistas, es decir que pueden tener lugar a lo largo de la cadena de frío, incluyendo las condiciones de almacenamiento después de la producción y hasta el consumo (AFSSA, 2008).

El potencial de crecimiento de un microorganismo ( $\delta$ ) es la diferencia entre el  $\log_{10}$  ufc/g al final del ensayo y el  $\log_{10}$  ufc/g al comienzo del ensayo. Este parámetro depende de varios factores entre los que se pueden destacar los siguientes (UE, 2008):

- Cepa o cepas inoculadas.
- Daño o estrés (estado fisiológico) de las cepas inoculadas.
- Propiedades intrínsecas del alimento (pH,  $a_w$ , concentración de sal, microflora asociada, componentes antimicrobianos).
- Propiedades extrínsecas (perfil de temperatura, composición de gases).

De todos estos factores, es la temperatura la que mayor influencia puede tener en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento dado (EFSA, 2007).

La evaluación del potencial de crecimiento permite (AFSSA, 2008):

- Clasificar a los alimentos como LPC.
  - Cuando  $\delta > 0,5 \log_{10}$  ufc/g, el alimento se clasifica como LPC capaz de permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, no destinado a lactantes o a usos médicos especiales.
  - Cuando  $\delta \leq 0,5 \log_{10}$  ufc/g el alimento se clasifica como LPC que no permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, no destinado a lactantes o a usos médicos especiales.
- Cuantificar el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento de acuerdo con las condiciones previsibles entre la producción y el consumo, razonablemente definidas (por ejemplo, calcular la concentración al final de la vida útil partiendo de una concentración inicial).

- Determinar la concentración de *Listeria monocytogenes* en el momento de la producción que permitirá que se cumpla con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

La principal ventaja de este método es que es relativamente simple de llevar a cabo y que los resultados se pueden usar directamente de acuerdo a lo anteriormente dicho. La desventaja es que es poco flexible en su interpretación: los resultados solo sirven para el alimento estudiado en las condiciones determinadas, de tal forma que cada vez que hay un cambio en el producto o proceso, se deben llevar a cabo nuevos estudios, con los niveles de réplicas y repeticiones adecuados para que el resultado sea estadísticamente significativo.

#### *Estudios para establecer la velocidad máxima de crecimiento*

Las desventajas del estudio para determinar el potencial de crecimiento se pueden resolver combinando modelos de microbiología predictiva y ensayos para evaluar la velocidad de crecimiento (por ejemplo,  $\mu_{max}$ ) (AFSSA, 2008). Estos experimentos son más caros y consumen más tiempo que los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento. Estos estudios están restringidos a aquellos casos en los que se puede aplicar la microbiología predictiva y se deben llevar a cabo en laboratorios con experiencia en desarrollo y aplicación de modelos matemáticos predictivos.

Un ensayo de desafío para evaluar la velocidad de crecimiento consiste esencialmente en un estudio llevado a cabo en el laboratorio en el que se mide la velocidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento contaminado de forma artificial y almacenado a una temperatura apropiada. La temperatura usada para la experimentación no necesita ser la misma que la utilizada para llevar a cabo las predicciones, ya que es posible predecir lo que ocurre a temperaturas distintas a la del estudio si se dispone de un modelo predictivo secundario (por ejemplo, un modelo polinómico) o a lo largo de un perfil tiempo temperatura que se escoge como representación de las condiciones de transporte, distribución y almacenamiento previsibles.

Técnicamente, una vez que se ha concluido el ensayo a la temperatura del estudio, la velocidad máxima de crecimiento de la *Listeria monocytogenes* se puede deducir de la curva de crecimiento obtenida. Para ello se representa el logaritmo natural del número de células en la fase exponencial frente al tiempo de almacenamiento, se realiza una regresión lineal y la pendiente de la curva de regresión representa la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), el resultado se puede expresar en  $horas^{-1}$  o  $días^{-1}$ .

La velocidad máxima de crecimiento depende de los siguientes factores:

- La cepa o cepas inoculadas.
- Propiedades intrínsecas del alimento (pH,  $a_w$ , concentración de sal, microflora asociada, componentes antimicrobianos).
- Propiedades extrínsecas (perfil de temperatura, composición de gases).

Si tenemos estudios a diferentes temperaturas se puede construir un modelo matemático secundario que nos permita deducir la velocidad máxima de crecimiento a temperaturas distintas, siempre en el mismo alimento.

Este tipo de ensayo de desafío permite obtener la siguiente información (AFSSA, 2008):

- Una estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en un momento dado de la vida útil del alimento si se conoce la concentración inicial en el alimento inmediatamente después de su elaboración.
- Una estimación de la concentración máxima de *Listeria monocytogenes* permitida en un alimento que puede estar presente el día en que se elaboró con objeto de cumplir con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

### Estudios de durabilidad

Los estudios de durabilidad permiten evaluar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento durante el almacenamiento bajo unas condiciones razonablemente previsibles sin que se produzca una inoculación artificial, solamente considerando la contaminación natural del mismo. Estos estudios son más realistas que los ensayos de desafío, ya que se estudia la evolución de la contaminación natural del producto. No obstante, la interpretación de los estudios de durabilidad puede resultar difícil debido a que la prevalencia de unidades contaminadas con *Listeria monocytogenes* puede ser muy baja, la baja concentración de *Listeria monocytogenes* presente en el producto objeto de estudio y la heterogeneidad de la distribución de *Listeria monocytogenes* en el alimento. Esto implicaría la necesidad de llevar a cabo otros ensayos complementarios como los ensayos de desafío.

El registro de los estudios de durabilidad llevados a cabo en el mismo producto bajo las mismas condiciones de procesado, como representación de la variabilidad en las condiciones de fabricación, permiten evaluar los niveles de *Listeria monocytogenes* en el alimento objeto del estudio, al final del ensayo. Se puede usar para evaluar la proporción (con su intervalo de confianza asociado) de unidades (unidades comerciales) que excederían el valor límite de 100 ufc/g al final de la vida útil después del periodo de almacenamiento, reflejando las condiciones de almacenamiento y distribución previsibles. En este tipo de estudios el nivel de confianza aumenta con la cantidad de datos disponibles. Cuantas más unidades de producto sean evaluadas, más fiable será el estudio de vida útil (AFSSA, 2008) (UE, 2008).

### Conclusiones del Comité Científico

1. La evidencia de que los alimentos listos para su consumo (LPC) no superarán el límite de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* para cada producto a lo largo de su vida útil (Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005), se debe basar en estudios de vida útil, que consistirán inicialmente en el conocimiento de si el alimento permite o no el desarrollo de *L. monocytogenes* a partir de la información sobre la composición específica del alimento en cuestión (características intrínsecas y extrínsecas) y comparación con datos procedentes de la literatura científica relevante relativa a las características de crecimiento y supervivencia del microorganismo patógeno en cuestión.
2. Los estudios de vida útil se deben llevar a cabo en las industrias cuando concurren las siguientes circunstancias:
  - Desarrollo de nuevos productos o modificación de los existentes.

- Desarrollo de nuevos procesos o modificaciones sustanciales de procesos previos.
  - Desarrollo de nuevos envases y procedimientos de envasado.
  - Cualquier cambio significativo en los ingredientes y en el envasado de un producto existente.
  - Cambios de lugar de producción o equipo de producción.
  - Cuando no hay estudios previos de vida útil.
3. El histórico de datos de productos fabricados, la microbiología predictiva y los estudios de vida útil específicos en laboratorio (estudios de durabilidad y ensayos de desafío) son herramientas adicionales que se utilizarán en caso de que los estudios de composición del alimento y condiciones de proceso y comparación con datos publicados en revistas científicas proporcionen dudas respecto a la posibilidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.
  4. Los modelos matemáticos predictivos proporcionan un medio poco costoso para minimizar el muestreo microbiológico en estudios de vida útil cuando el producto está sujeto a un ligero proceso de formulación o cambio y en las fases tempranas de desarrollo. Sin embargo, se deben utilizar con precaución y solo por personal entrenado, con experiencia y conociendo las limitaciones y las condiciones de uso. Se recomienda que se consulte con una entidad competente antes de su uso.
  5. En general, los ensayos de desafío solo se usarán cuando otros métodos de evaluación de la inocuidad o estabilidad del alimento no se pueden llevar a cabo o no dejan suficientemente claro que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento o existen dudas sobre la idoneidad de la vida útil establecida para dicho alimento. Deben usarse con gran cautela y se recomienda la consulta con una entidad competente y con experiencia en este tipo de estudios antes de su uso.
  6. La principal ventaja del ensayo de desafío para obtener el potencial de crecimiento es su relativa simplicidad para llevarse a cabo y que los resultados se pueden usar directamente. La principal desventaja es que es poco flexible en su interpretación y los resultados solo sirven para el alimento estudiado en las condiciones determinadas, de tal forma que cada vez que hay un cambio en el producto o proceso, se deben llevar a cabo nuevos estudios.
  7. Los estudios para obtener la velocidad máxima de crecimiento permiten disponer de una estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en un momento dado de la vida útil del alimento si se conoce la concentración inicial del alimento inmediatamente después de su elaboración y una estimación de la concentración máxima de *Listeria monocytogenes* permitida en un alimento, que puede estar presente el día en que se elaboró, con objeto de cumplir con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.
  8. Los estudios de durabilidad en alimentos son más realistas que los estudios de desafío ya que se estudia la evolución de la contaminación natural de los mismos. Sin embargo, la interpretación de los estudios de durabilidad puede resultar difícil debido a que la prevalencia de unidades contaminadas con *Listeria monocytogenes* sea muy baja, la baja concentración de *Listeria monocytogenes* presente en el producto objeto de estudio y la heterogeneidad de la distribución de *Listeria monocytogenes* en el alimento.
  9. Las industrias deben establecer sus propios protocolos y procedimientos de operación o de obtención de información para permitir una determinación de la vida útil del producto consistente y exacta. Si la industria no tiene los recursos suficientes para determinar la vida útil, se recomienda

que se busque el consejo de un centro o laboratorio competente, con la experiencia suficiente y acreditación reconocida para llevar a cabo pruebas microbiológicas y evaluación de vida útil de alimentos.

10. Es recomendable que la industria aplique un margen de seguridad en los estudios de vida útil, lo que permite tener en cuenta las condiciones previsibles de uso que pueden afectar a la inocuidad y a la vida útil del producto. En la aplicación del margen de seguridad la industria debe tener en cuenta cualquier variación esperada durante la producción, transporte, almacenamiento y uso del alimento.
11. Tanto si los estudios de vida útil se realizan en la industria como si se realizan por un laboratorio reconocido, se deben utilizar métodos microbiológicos de referencia o reconocidos internacionalmente (por ejemplo, ISO). Si se utilizan métodos propios se deben validar y documentar convenientemente para demostrar su equivalencia con los métodos de referencia.

## Referencias

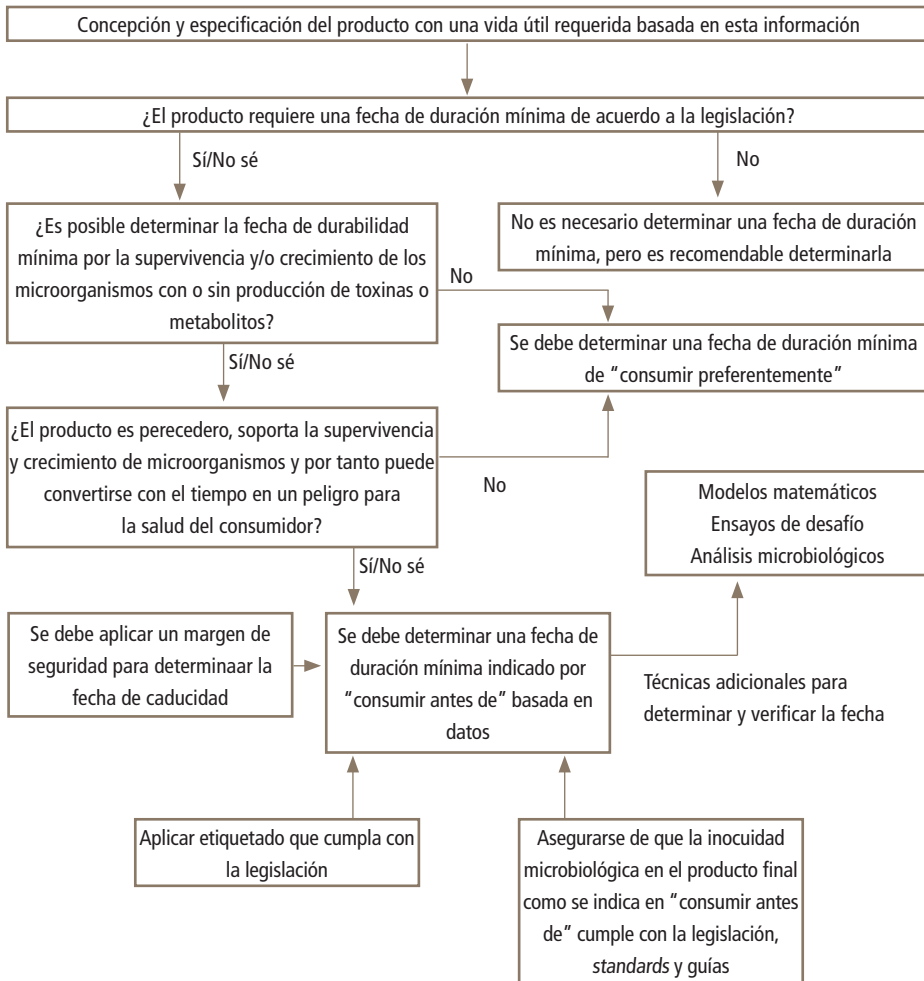
- AFSSA (2008). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Technical Guidance Document on shelf life studies for *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. EU Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*.
- Betts, G. (2010). Challenge testing protocols for assessing the safety and quality of food and drink. *Campden BRI Guideline*, 63.
- CFA (2010). Chilled Food Association. Shelf life of ready to eat foods in relation to *L. Monocytogenes*. Guidance for food business operators. Disponible en: <http://www.chilledfood.org/Resources/Chilled%20Food%20Association/Public%20Resources/Shelf%20life%20of%20RTE%20foods%20in%20relation%20to%20Lm%20FINAL%20v1.1.1%2023%203%2010.pdf> [acceso: 21-6-11].
- Combase (2010). Combined database por predictive microbiology. Disponible en: <http://www.combase.cc> [acceso: 21-6-11].
- Dalgaard, P. (2009). Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) software v. 3.1. National Food Institute (DTU Food), Technical University of Denmark. Disponible en: <http://sssp.dtuqua.dk/Download.aspx> [acceso: 21-6-11].
- EFSA (2007). European Food Safety Authority. 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. *The EFSA Journal*, 599, pp: 1-42.
- FDA (2001). United States Food and Drug Administration. Factors that influence microbial growth. Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094141> [acceso: 21-6-11].
- FSAI (2003). Food Safety Authority of Ireland. HACCP a food safety management system: Terminology explained. Disponible en: [http://www.fsai.ie/resources\\_and\\_publications/haccp\\_publications.html](http://www.fsai.ie/resources_and_publications/haccp_publications.html) [acceso: 21-6-11].
- FSAI (2005a). Food Safety Authority of Ireland. Guidance Note No. 18. Determination of Product Shelf-Life. Disponible en [http://www.fsai.ie/resources\\_and\\_publications.html](http://www.fsai.ie/resources_and_publications.html) [acceso: 21-6-11].
- FSAI (2005b). Food Safety Authority of Ireland. The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food. Disponible en: [http://www.fsai.ie/resources\\_and\\_publications.html](http://www.fsai.ie/resources_and_publications.html) [acceso: 21-6-11].
- Jay, J.M. (1992). Intrinsic and extrinsic parameters of foods that affect microbial growth. En libro: *Modern Food Microbiology*, 4ª edición. New York. Jay, J.M. Chapman & Hall, pp: 38-62.
- Luber, P., Scott, C., Christophe, D., Jeff, F., Atin, D. y Ewen, C.D.T. (2011). Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization. Recommendations for improved prevention and control. *Food Control*, 22, pp: 1535-1549.
- Mc Donald, K. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52, pp: 1-27.



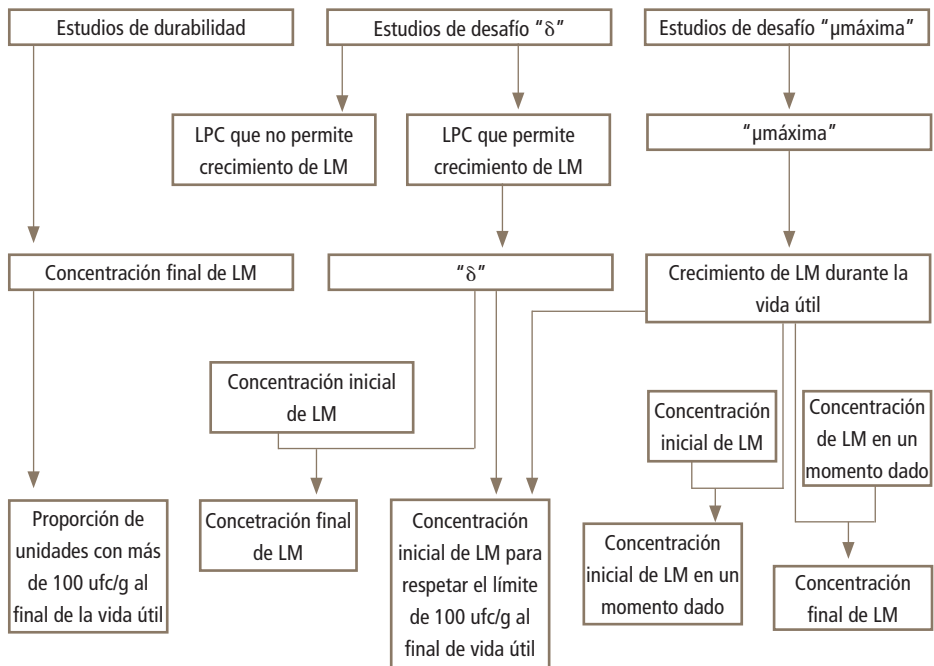
- Metris, A., George, S.M., Mackey, B.M. y Baranyi, J. (2008) Modelling the variability of single cell lag times for *Listeria* innocua populations after sublethal and lethal heat treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (22), pp: 6949-6955.
- Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. BOE 202 de 24 de agosto de 1999, pp: 437-441.
- Scott, V.N., Swanson, K.M., Freier, T.A., Pruet W.P., Sveum, W.H. y Hall, P.A. (2005). Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food Protection Trends*, 25 (11), pp: 818-825.
- UE (2004). Corrigendum to Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. DO L 226 de 25 de junio de 2004, pp: 3.
- UE (2005) Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22 de diciembre de 2005, pp: 12-45.
- UE (2008). Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Disponible en: [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc\\_Listeria\\_monocytogenes\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_Listeria_monocytogenes_en.pdf) [acceso: 21-6-11].

<b>Fuentes internacionales de datos</b>	
<i>Athlone Institute of Technology</i>	<a href="http://www.ait.ie/">www.ait.ie/</a>
<i>An Bord Bia</i>	<a href="http://www.bordbia.ie/">www.bordbia.ie/</a>
<i>Carlow Institute of Technology</i>	<a href="http://www.itcarlow.ie/news_events/index.php">www.itcarlow.ie/news_events/index.php</a>
<i>Codex Alimentarius</i>	<a href="http://www.codexalimentarius.net">www.codexalimentarius.net</a>
<i>Consumers Association of Ireland</i>	<a href="http://www.consumerassociation.ie/">www.consumerassociation.ie/</a>
<i>Cork Institute of Technology</i>	<a href="http://www.cit.ie/">www.cit.ie/</a>
<i>Dept. of Agriculture and Food</i>	<a href="http://www.irlgov.ie/daff/">www.irlgov.ie/daff/</a>
<i>Dublin Institute of Technology</i>	<a href="http://www.dit.ie/DIT/Homepage/index.html">www.dit.ie/DIT/Homepage/index.html</a>
<i>Dundalk Institute of Technology</i>	<a href="http://www.dkit.ie/">www.dkit.ie/</a>
<i>European Committee for Standardisation</i>	<a href="http://www.cenorm.be/cenorm/index.htm">www.cenorm.be/cenorm/index.htm</a>
<i>European Food Safety Authority</i>	<a href="http://www.efsa.eu.int">www.efsa.eu.int</a>
<i>European Legislation</i>	<a href="http://europa.eu.int/eur-lex/en/index.html">http://europa.eu.int/eur-lex/en/index.html</a>
<i>European Union Risk Analysis Information Network</i>	<a href="http://www.eu-rain.com/">www.eu-rain.com/</a>
<i>Excellence Ireland Hygiene</i>	<a href="http://www.hygienemark.com/">www.hygienemark.com/</a>
<i>Food and Agriculture Organisation</i>	<a href="http://www.fao.org/">www.fao.org/</a>
<i>Food and Drug Administration</i>	<a href="http://www.fda.gov/default.htm">www.fda.gov/default.htm</a>
<i>Food Safety Authority of Ireland</i>	<a href="http://www.ifrn.bbsrc.ac.uk/">www.ifrn.bbsrc.ac.uk/</a>
<i>Galway-Mayo Institute of Technology</i>	<a href="http://www.gmit.ie/">www.gmit.ie/</a>
<i>International Journal of Food Microbiology</i>	<a href="http://www.elsevier.com/">www.elsevier.com/</a>
<i>International Life Sciences Institute</i>	<a href="http://www.ilsa.org/">www.ilsa.org/</a>
<i>Institute of Food Research</i>	<a href="http://www.fsai.ie">www.fsai.ie</a>
<i>Institute of Food Science and Technology</i>	<a href="http://www.ifst.org/">www.ifst.org/</a>
<i>Institute of Food Technologists</i>	<a href="http://www.ift.org/">www.ift.org/</a>
<i>International Standards Organisation</i>	<a href="http://www.iso.org/iso/">www.iso.org/iso/</a>
<i>Irish Legislation</i>	<a href="http://www.irishstatutebook.ie/front.html">www.irishstatutebook.ie/front.html</a>
<i>Irish National Accreditation Board</i>	<a href="http://www.inab.ie/">www.inab.ie/</a>
<i>Journal of Food Protection</i>	<a href="http://www.foodprotection.org/">www.foodprotection.org/</a>
<i>Journal of Food Safety</i>	<a href="http://www.foodscipress.com/">www.foodscipress.com/</a>
<i>Limerick Institute of Technology</i>	<a href="http://www.lit.ie/">www.lit.ie/</a>
<i>Microbial Risk Assessment of Meat Products</i>	<a href="http://smas.chemeng.ntua.gr/miram/">http://smas.chemeng.ntua.gr/miram/</a>
<i>National University of Ireland</i>	<a href="http://www.nui.ie/">www.nui.ie/</a>
<i>Physical Properties of Food Database</i>	<a href="http://www.nelfood.com">www.nelfood.com</a>
<i>Relay (Research for the Food Industry)</i>	<a href="http://www.relayresearch.ie/">www.relayresearch.ie/</a>
<i>Teagasc</i>	<a href="http://www.teagasc.ie/">www.teagasc.ie/</a>
<i>University of Limerick</i>	<a href="http://www.ul.ie/">www.ul.ie/</a>
<i>Waterford Institute of Technology</i>	<a href="http://www.wit.ie/">www.wit.ie/</a>

1. Determinación de la vida útil de un alimento (FSAI, 2010)



## 2. Datos obtenidos de un ensayo de desafío y estudios de durabilidad (AFSSA, 2008)



### Definiciones

**Unidades Formadoras de Colonias (ufc).** Células microbianas que forman una única colonia en una placa con medio de cultivo apropiado.

**pH.** Medida de la acidez o alcalinidad de un alimento.

**Vida útil.** La vida útil se define como el periodo de tiempo durante el cual un producto permanece seguro y cumple con sus especificaciones de calidad bajo las condiciones de almacenamiento esperadas. La vida útil determina la fecha de duración expresada en la etiqueta tal como indica la legislación vigente.

**Estudios de vida útil.** Los estudios de vida útil deben demostrar que el alimento cumple con el límite del criterio de seguridad (máximo de 100 ufc/g) establecido para *Listeria monocytogenes* a lo largo de su vida útil.

**Actividad de agua ( $a_w$ ).** Medida del agua disponible para la actividad metabólica y crecimiento de un microorganismo.

**Potencial de crecimiento ( $\delta$ ).** Diferencia entre el  $\log_{10}$  ufc/g al final del ensayo de desafío y el  $\log_{10}$  ufc/g al comienzo del ensayo.

**Velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ).** Es la pendiente de la línea de regresión del crecimiento exponencial durante un ensayo de desafío.



# Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo de la exposición de lactantes y niños de corta edad a nitratos por consumo de acelgas en España

## Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, M<sup>o</sup> Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M<sup>o</sup> Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas-Salvadó, M<sup>o</sup> Carmen Vidal Carou.

## Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-004

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011

## Grupo de Trabajo

Ana M<sup>o</sup> Cameán Fernández (Coordinadora)  
M<sup>o</sup> Rosa Martínez Larrañaga  
Cristina Nerín de la Puerta  
Antonio Pla Martínez  
Ricardo López Rodríguez (AESAN)

## Resumen

La principal vía de exposición en humanos a los nitratos es a través de la dieta, siendo las hortalizas la principal fuente dietética pues proporcionan entre el 80 y 85% de la ingesta diaria. Destacan las concentraciones relativamente elevadas encontradas en hortalizas, como rúcula, lechuga y espinacas.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha evaluado recientemente los posibles efectos en niños de los nitratos contenidos en algunas verduras de hoja, concluyendo que los contenidos de nitratos en lechuga no representan un riesgo, aunque en el caso de las espinacas, se indica la posible existencia de riesgo de metahemoglobinemia en niños de 1-3 años si el consumo de éstas excede de una ración diaria (EFSA, 2010).

El presente informe presenta una evaluación del riesgo de la exposición de lactantes y niños de corta edad a nitratos por consumo de acelgas en España, verduras de hoja con alto contenido en nitratos, que no han sido objeto de evaluación por parte de EFSA dado que su consumo a nivel europeo es muy bajo y localizado.

A partir de los datos proporcionados por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) correspondientes a la concentraciones de nitratos en acelgas durante los años 2000-2009, de un total de 1.018 muestras, se observa una gran variabilidad en los contenidos, con una concentración mediana de 1.562 mg nitrato/kg acelgas, siendo superiores a los contenidos de nitratos en espinacas (mediana: 816 mg/kg) publicados por EFSA a nivel europeo.

Asumiendo que el consumo de acelgas en niños (de 3 meses a 1 año) es igual al de espinacas para niños de corta edad de la población europea, y aceptando como válido para niños de 1-3 años el consumo de acelgas en niños de 7-12 años del modelo de dieta española (AESAN, 2006), las estimaciones de exposición crónica por consumo sólo de acelgas en niños (de 1-3 años), considerando tres escenarios de concentración de nitratos, 1.562, 3.000 y 3.700 mg nitratos/kg (mediana, límite