



GUÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS

FEDACOVA



FEDERACIÓN EMPRESARIAL
DE AGROALIMENTACIÓN
DE LA COMUNIDAD VALENCIANA



GENERALITAT
VALENCIANA
Conselleria de Sanitat
Universal i Salut Pública

GUÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS

Autores:

Cristina Alapont Gutiérrez, Plinio Simon Soriano y M^a José Torrejón Lanero. (Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública)

Con la colaboración técnica de la Federación Empresarial de Agroalimentación de la Comunidad Valenciana

Revisado por:

Dr. Guillermo Cebrián Auré. Profesor Ayudante Doctor.
Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos –
Universidad de Zaragoza

Dra. M^a Carmen López Mendoza. Catedrática de Tecnología de los Alimentos. Universidad CEU Cardenal Herrera

Técnicos expertos del sector empresarial:

Rafael Vidal de Ahumados Sabal S.L. , Verdifresh S.L.U. , M^a Lluïsa Andrés de Carnes Frescas S.A. y Carlos Araujo de Gourmet S.A.
Inspectores de Salud Pública pertenecientes a la Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Laboratorios de Salud Pública

Edita:

FEDACOVA

1^a Edición no bienal

Valencia Enero 2020

Maquetación e impresión:

Moma Publicidad

Depósito legal:.....

PRESENTACIÓN

El Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002, establece que, el responsable legal de la seguridad alimentaria de un producto alimenticio puesto en el mercado es el explotador de la empresa alimentaria.

El marcado de la fecha de duración mínima o fecha de caducidad es una mención obligatoria conforme al Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre información alimentaria facilitada al consumidor. El operador alimentario responsable de esta información ha de garantizar la exactitud de esta información.

La Federación Empresarial de Agroalimentación de la Comunidad Valenciana (FEDACOVA), se hizo eco de la preocupación por parte de los responsables de indicar esta información, de la necesidad de disponer de herramientas que les permita establecer la vida útil de los alimentos de forma precisa, permitiendo garantizar la seguridad del alimento que va a ser consumido.

La Conselleria de Sanidad Universal y Salud Pública que promueve toda actividad cuyo objetivo es la protección de la salud de los consumidores, ha impulsado la elaboración de este documento con objeto de ser una herramienta práctica para el operador alimentario. Técnicos de la Dirección General de Salud Pública y Adicciones tras realizar una profunda revisión bibliográfica y de literatura científica y a partir de un primer borrador elaborado por FEDACOVA, han concluido este documento.

El documento ha sido difundido para su revisión y consenso a empresas alimentarias de la Comunitat Valenciana a través de FEDACOVA y también a inspectores de la Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Laboratorios de Salud Pública. Además, este documento ha sido revisado por investigadores científicos con reconocida solvencia en la materia y que han desarrollado su actividad investigadora en el ámbito de la microbiología de los alimentos.

Por último, agradecer el esfuerzo realizado por los autores de este documento y, en general, a todos los que han aportado sus conocimientos, dudas o aclaraciones ya que sin ellos el objetivo no habría sido conseguido.

Federico Félix Real
Presidente de FEDACOVA

CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Objeto y alcance de la guía	2
3. Base legal y responsabilidades	2
4. Mecanismos de deterioro y alteración de los alimentos.....	5
5. Factores que afectan a la vida útil: factores intrínsecos y extrínsecos.	9
6. Diferencias entre fecha de consumo preferente y fecha de caducidad.....	12
7. Peligros a considerar durante la vida útil de productos conservados en refrigeración.	14
8. Etapas para la determinación de la vida útil.	15
8.1. Descripción de las características del producto y del proceso.	15
8.2. Identificación de las causas probables de pérdida de seguridad.	17
8.3. Determinación de fecha de caducidad o fecha de consumo preferente.	19
8.4. Validación de la vida útil: herramientas.	21
8.4.1. Características físico-químicas.....	27
8.4.2. Literatura científica.	27
8.4.3. Histórico de datos	29
8.4.4. Estudios complementarios.	32
A) Análisis sensorial.....	32
B) Microbiología predictiva/modelos matemáticos.....	32
C) Análisis laboratoriales:.....	33
I) Análisis de microorganismos indicadores de alteración.....	33
Ii) Estudios de durabilidad.	35
Iii) Ensayos de desafío (challenge test)	37

Iv) Indicadores físico-químicos de deterioro en productos de la pesca frescos	38
Anexo i: Marcado de fechas de caducidad y consumo preferente.....	41
Anexo ii: Características de los principales peligros asociados a la vida útil y medidas de control.	44
Anexo iii: Criterios microbiológicos relevantes para la vida útil de los productos alimenticios	52
Anexo iv: Informes de laboratorio para los estudios de durabilidad y de desafío en relación a listeria monocytogenes.	58
Anexo v: Ejemplos de casos prácticos para el diseño del estudio de validación de vida útil.	63
Referencias bibliográficas.	123

INDICE TABLAS

Tabla 1. Principales mecanismos de alteración y ejemplos de cambios organolépticos de diferentes grupos de alimentos.	6
Tabla 2. Temperatura y duración de cada etapa de la cadena de distribución de alimentos.....	22
Tabla 3. Recomendaciones para establecer la vida útil de productos refrigerados envasados al vacío o en atmósfera modificada.....	28
Tabla 4. Resultados de test de desafío para evaluar el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> sobre diferentes productos.	28
Tabla 5. Estimación de vida útil de productos de la pesca mediante microbiología predictiva considerando <i>L. monocytogenes</i> e histamina.	29
Tabla 6. Ejemplo de cálculo del límite superior del intervalo de confianza mediante la herramienta de la red BIOQURA con un nivel de confianza del 95%.	30
Tabla 7. Ejemplos de signos de alteración y algunos microorganismos responsables en carnes, pescados y derivados.....	34
Tabla 8. Métodos analíticos de referencia para el recuento de los principales peligros limitantes de la vida útil de los productos refrigerados y sus límites legales o de aceptabilidad.....	36
Tabla 9. Principales indicadores físico-químicos de deterioro en pescado fresco..	39
Tabla 10. Ejemplos de posibles marcados de fecha en diferentes grupos de alimentos.....	43
Tabla 11. Características de crecimiento e inactivación de <i>Listeria monocytogenes</i>	45

Tabla 12. Características de formación, medidas de control y recomendaciones del peligro histamina.	46
Tabla 13. Características de crecimiento, producción de toxinas e inactivación de <i>Clostridium botulinum</i>	47
Tabla 14. . Características de crecimiento, producción de toxinas e inactivación de <i>Yersinia enterocolítica</i>	50
Tabla 15. Características de crecimiento, producción de toxinas e inactivación de <i>Bacillus cereus</i>	51
Tabla 16. Información mínima que debe incluir un informe de estudio de vida útil realizado mediante ensayo de desafío para <i>L. monocytogenes</i> para estimar el potencial de crecimiento.	59
Tabla 17. Información mínima que debe incluir un informe de estudio de vida útil realizado mediante ensayo de desafío para <i>L. monocytogenes</i> para estimar la velocidad máxima de crecimiento.	61
Tabla 18. Información mínima que debe incluir un informe de estudio de vida útil realizado mediante estudio de durabilidad para <i>L. monocytogenes</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales factores intrínsecos que pueden afectar a la vida útil en relación con el crecimiento microbiano.....	10
Figura 2. Principales factores extrínsecos que pueden afectar a la vida útil en relación con el crecimiento microbiano.....	11
Figura 3. Diferencias entre fecha de caducidad y consumo preferente.	13
Figura 4. Descripción de las etapas a seguir para establecer y validar la vida útil de los alimentos.....	15
Figura 5. Modelo de ficha descriptiva.....	16
Figura 6. Representación de los escenarios que pueden darse durante la vida útil de los alimentos basado en documento guía: How to Determine the shelf Life of Food.	18
Figura 7. Árbol de decisiones para el marcado de fechas en los productos alimenticios.	19
Figura 8. Árbol de decisiones para realizar estudios de vida útil dirigidos al peligro <i>Listeria monocytogenes</i>	24
Figura 9. Árbol de decisiones para realizar estudios de vida útil dirigidos al peligro <i>Clostridium botulinum</i> no proteolítico.....	25
Figura 10. Árbol de decisiones para realizar estudios de vida útil dirigidos al peligro histamina.....	26
Figura 11. Árbol de decisiones para la aplicación del criterio microbiológico de seguridad alimentaria de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos listos para el consumo distintos de los destinados a lactantes o usos médicos especiales.	56

1. INTRODUCCIÓN

La vida útil se define como el periodo de tiempo durante el cual un producto alimenticio:

- Permanece inocuo.
- Conserva las características sensoriales, físico-químicas, microbiológicas y funcionales deseadas.
- Cuando corresponda, cumple cualquier declaración nutricional o de propiedades saludables que haga referencia al mismo, siempre que se cumplan las condiciones de conservación recomendadas.

Por ello, para estimar la vida útil de un producto alimenticio es determinante conocer los diferentes mecanismos de alteración que conllevarán a su deterioro, incluyendo la pérdida de las características organolépticas que afectan a la calidad sensorial del alimento, la pérdida de las propiedades nutricionales y saludables declaradas y la pérdida de inocuidad del alimento.

Los estudios de vida útil deben llevarse a cabo en las siguientes circunstancias:

- Desarrollo de nuevos productos/procesos o modificación de los existentes.
- Uso de nuevos envases y procedimientos de envasado.
- Cualquier cambio significativo en los ingredientes, lugar de producción o equipo de producción.
- Cuando no hay estudios previos de vida útil.

Los estudios de validación de la vida útil de un producto alimenticio deben consistir en obtener y documentar evidencias que demuestren que durante dicho periodo el producto es seguro y mantiene las características de calidad que le son propias, teniendo en cuenta las condiciones previsibles de almacenamiento, distribución y uso.

Para determinar con precisión la vida útil de un alimento, es indispensable partir de un sistema de gestión de la seguridad alimentaria eficaz, que implemente medidas de control adecuadas para prevenir, eliminar o reducir a un nivel aceptable los peligros que pueden darse durante la elaboración del producto. Para ello, el operador alimentario deberá implantar un sistema basado en los principios del APPCC.

La determinación de la vida útil deberá estar integrada en los procedimientos basados en el APPCC y en las buenas prácticas de higiene. Por lo que la documentación relacionada con la determinación y validación de la vida útil deberá ser archivada y mantenida por los operadores económicos como una parte de los

procedimientos basados en el APPCC. La cantidad de documentación generada deberá ser proporcional al tamaño y naturaleza de la empresa alimentaria.

2. OBJETO Y ALCANCE DE LA GUÍA

Esta guía tiene el propósito de orientar al operador económico para determinar la vida útil de los productos alimenticios cuando ésta se establezca por motivos de seguridad, entendiendo por producto no seguro aquel que es nocivo y/o no apto para el consumo según las definiciones del Reglamento (CE) N° 178/2002.

Quedan excluidos aquellos productos cuya normativa específica regula la fecha de consumo, como por ejemplo los huevos, así como aquellos productos incluidos en el punto 1, apartado del Anexo X del Reglamento (CE) N° 1169/2011, sobre información alimentaria facilitada al consumidor, en el que se describen los alimentos exentos del marcado de fechas.

Quedan excluidos los alimentos que se presenten sin envasar y los envasados en los lugares de venta a petición del consumidor, según establece el Real Decreto 126/2015, por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor.

3. BASE LEGAL Y RESPONSABILIDADES

El artículo 14 del **Reglamento (CE) N° 178/2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria**, establece que *“No se comercializarán alimentos que no sean seguros (...), se considerará que un alimento no es seguro cuando sea nocivo para la salud o no sea apto para el consumo”*. Del mismo modo, dicho artículo indica que:

- *“A la hora de determinar si un alimento es **nocivo** para la salud se tendrán en cuenta los probables efectos inmediatos y a corto y largo plazo de ese alimento, no sólo para la salud de la persona que lo consume, sino también para la de sus descendientes; los posibles efectos tóxicos acumulativos; la sensibilidad particular de orden orgánico de una categoría específica de consumidores, cuando el alimento esté destinado a ella”*.
- *“A la hora de determinar si un alimento **no es apto** para el consumo humano, se tendrá en cuenta si el alimento resulta inaceptable para el consumo humano de acuerdo con el uso para el que esté destinado, por estar contaminado por una materia extraña o de otra forma, o estar putrefacto, deteriorado o descompuesto”*.

- “A la hora de determinar si un alimento **no es seguro**, deberá tenerse en cuenta lo siguiente: las condiciones normales de uso del alimento por los consumidores y en cada fase de producción, la transformación y la distribución, y la información ofrecida al consumidor, incluida la que figura en la etiqueta, u otros datos a los que el consumidor tiene por lo general acceso, sobre la prevención de determinados efectos perjudiciales para la salud que se derivan de un determinado alimento o categoría de alimentos”.

Por otro lado, el artículo 17 del citado Reglamento, en el que se establecen las responsabilidades expone que “los explotadores de empresas alimentarias y empresas de piensos se asegurarán, en todas las etapas de la producción, la transformación y la distribución que tienen lugar en las empresas bajo su control, de que los alimentos o piensos cumplen los requisitos de la legislación alimentaria pertinentes a los efectos de sus actividades y verificarán que se cumplen dichos requisitos”.

El **Reglamento (CE) N° 852/2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios**, en sus artículos 4 y 5, hace recaer en los operadores económicos la responsabilidad de garantizar la seguridad alimentaria, mediante un enfoque preventivo, a través de la adopción de buenas prácticas de higiene y la implantación y mantenimiento de sistemas de autocontrol basados en los principios APPCC.

Así mismo, en su artículo 4, establece que “los operadores de empresa alimentaria adoptarán, en la medida en que proceda, las siguientes medidas de higiene específicas” entre las que describe, en su punto a) el “cumplimiento de los criterios microbiológicos para los productos alimenticios”.

En este sentido, el **Reglamento (CE) N° 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios**, establece en su artículo 3 que “los operadores de las empresas alimentarias velarán por que los productos alimenticios cumplan los criterios microbiológicos pertinentes establecidos en el anexo I”, garantizando que “los criterios de seguridad alimentaria aplicables durante toda la vida útil de los productos puedan respetarse en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización”. El punto 2 del citado artículo establece que, “cuando sea necesario, los explotadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria.”

El anexo II Reglamento (CE) N° 2073/2005 indica que los estudios de vida útil 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.

“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.

4

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

El Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del consejo de 25 de Octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, en su artículo 9, establece como información alimentaria obligatoria la fecha de duración mínima.

El artículo 2 de este Reglamento define la «fecha de duración mínima de un alimento» como “la fecha hasta la que el alimento conserva sus propiedades específicas cuando se almacena correctamente”. Así mismo, el artículo 24 establece que “en el caso de alimentos microbiológicamente muy perecederos y que por ello puedan suponer un peligro inmediato para la salud humana después de un corto período de tiempo, la fecha de duración mínima se cambiará por la fecha de caducidad. Después de su «fecha de caducidad», el alimento no se considerará seguro de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 14, apartados 2 a 5, del Reglamento (CE) N° 178/2002.”

El artículo 25 del Reglamento (UE) N° 1169/2011 establece que “Con el fin de permitir la conservación o utilización adecuadas de los alimentos una vez abierto el envase, se indicarán, cuando proceda, las condiciones y/o la fecha límite de consumo.” En su artículo 3, en el que describe los objetivos generales de la

información alimentaria, establece que *“la información alimentaria perseguirá un nivel de protección elevado para la salud y los intereses de los consumidores, proporcionando una base para que el consumidor final tome decisiones con conocimiento de causa y utilice los alimentos de una forma segura, teniendo en cuenta consideraciones sanitarias, económicas, medioambientales, sociales y éticas”*.

El artículo 8 del citado Reglamento establece que *“el operador de empresa alimentaria responsable de la información alimentaria será el operador con cuyo nombre o razón social se comercialice el alimento o, en caso de que no esté establecido en la Unión, el importador del alimento al mercado de la Unión”*. El fabricante, envasador o reenvasador de un producto alimenticio es el responsable de establecer la vida útil y, en su caso, de llevar a cabo los estudios pertinentes ya que, este operador es quien debe tener conocimiento de los procesos aplicados y las características físico-químicas del alimento.

El Real Decreto 126/2015, por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por lo titulares del comercio al por menor, establece que los alimentos envasados por los titulares del comercio de venta al por menor para su venta inmediata en el establecimiento o establecimientos de su propiedad requiere de marcado de vida útil.

El marcado de fechas, junto a las condiciones de conservación y uso, así como otras de las indicaciones obligatorias de la información al consumidor, son elementos que pueden influir en la seguridad de los alimentos durante el periodo que dure su comercialización.

4. MECANISMOS DE DETERIORO Y ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Los mecanismos de alteración de los alimentos se pueden clasificar en:

- Mecanismos físicos
- Mecanismos químicos y/o bioquímicos
- Mecanismos microbiológicos: patógenos o biota alterante.

Las diferentes maneras en que un alimento se deteriora y altera pueden ser muy complejas. Normalmente pueden darse simultáneamente varios mecanismos de deterioro y, en ocasiones, un mecanismo de deterioro puede dar lugar a otro tipo de deterioro. Conocer y comprender estos mecanismos permitirá planificar el procedimiento para determinar la vida útil.

La tabla 1 muestra ejemplos de los principales mecanismos de alteración y los cambios organolépticos que experimentan diferentes alimentos.

Tabla 1. Principales mecanismos de alteración y ejemplos de cambios organolépticos de diferentes grupos de alimentos.

GRUPO DE ALIMENTOS	PRODUCTOS	MECANISMOS DE DETERIORO	CAMBIOS LIMITANTES
DETERIORO EN FRUTAS Y VEGETALES En general pueden experimentar ablandamiento enzimático, crecimiento microbiano, magulladuras, pérdida de humedad y marchitamiento.	Bayas, frutos del bosque	Crecimiento de hongos, pérdida de humedad, deterioro enzimático.	Textura blanda, mohos visibles, apariencia de seco
	Frutas duras (manzana, melocotón...), patatas y pepino	Alteración enzimática, pérdida de humedad y germinación (patatas)	Textura blanda, textura seca, magulladuras, y producción de toxinas (patatas germinadas).
	Ensalada preparadas	Pérdida de humedad de los vegetales, oxidación	Pérdida de turgencia, cambio de apariencia, crecimiento microbiano, rancidez, cambio de coloración (marrón).
	Conservas de frutas (mermeladas...)	Oxidación, sinéresis, crecimiento microbiano	Separación de las fases sólido-líquido crecimiento de mohos y pérdida de sabor
	Frutos secos	Reacciones químicas y acciones enzimáticas	Cambios sabor, enranciamiento y color (marrón)
	Zumos de frutas	Oxidación y reacciones enzimáticas	Pérdida de sabor y nutrientes, turbidez
	Carne roja fresca	Oxidación, crecimiento microbiano	Pérdida de color, rancidez, malos olores y sabores
	Carne de ave	Crecimiento microbiano	Malos olores y sabores
	Longanizas frescas (embutidos) y bacon	Crecimiento microbiano, oxidaciones	Cambios microbianos, cambio color y rancidez (bacon)
	Jamón enlatado	Reacciones químicas y latas deteriorada	Pérdida de sabor. Generación de gas
Pan	Endurecimiento, reseo.	Textura y sabor rancio, seco y crecimiento de mohos.	

DETERIORO EN CARNE Y PRODUCTOS DERIVADOS

En general puede observarse crecimiento bacteriano superficial (limo), oxidación y pérdida de humedad en superficie (apariciencia reseca).

GRUPO DE ALIMENTOS	PRODUCTOS	MECANISMOS DE DETERIORO	CAMBIOS LIMITANTES
<p>DETERIORO EN CEREALES Y OTROS PRODUCTOS SECOS</p> <p>En general pueden experimentar aspecto reseco o correoso, crecimiento microbiano (hongos), endurecimiento, oxidación y ablandamiento (productos crujientes).</p>	Productos de aperitivo	Cambio de textura, oxidación.	Pérdida de crujiente, rancidez.
	Pasteles	Pérdida de humedad, cambios en almidón y crecimiento microbiano (hongos).	Formación de mohos, sabor y textura rancio, secos y duros.
	Pasta seca	Cambios del almidón y proteínas.	Cambios de textura, endurecimiento y roturas.
	Cereales desayuno	Pérdida de humedad, endurecimiento y oxidación.	Ablandamiento de cereales, pérdida de textura y color.
	Mezcla de productos secos	Absorción de humedad.	Apelmazamiento, dorado no enzimático, rancidez
	Especias	Crecimiento microbiano (mohos) pérdida de volátiles, reacciones químicas.	Crecimiento de mohos, cambio de sabor y pérdida de color.
	Confitería de chocolate	Migración de grasas y oxidación.	Cristalización de grasa, cambios de textura, endurecimiento y rancidez.
	Confitería de azúcar	Adsorción de humedad, oxidación.	Cambios de textura y rancidez.
	Bebidas carbonatadas	Evolución del gas, hidrólisis y oxidación	Pérdida de carbonatación, sabores extraños y rancidez
	<p>DETERIORO EN BEBIDAS</p> <p>Generalmente pueden experimentar pérdida de sabor, color y cambios en la turbidez.</p>	Cerveza	Oxidación y crecimiento microbiano
Café y té		Pérdida o absorción de volátiles y oxidación (café)	Cambio de sabor y rancidez (café)
Vino		Oxidación	Malos sabores y cambio de color

GRUPO DE ALIMENTOS	PRODUCTOS	MECANISMOS DE DETERIORO	CAMBIOS LIMITANTES
	Refrescos bajos en calorías	Hidrólisis	Pérdida de dulzor
DETERIORO EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS En general pueden experimentar oxidación, rancidez hidrolítica, crecimiento bacteriano, pardeamiento y cristalización lactosa.	Helados	Pérdida de humedad y oxidación.	Formación de cristales de hielo y rancidez (oxidación).
	Leche	Oxidación, reacciones hidrolíticas. Crecimiento microbiano	Rancidez y sabores extraños.
	Leche en polvo	Adsorción de humedad y oxidación.	Apelmazamiento, rancidez y cambios de sabor.
	Mantequilla	Oxidación	Rancidez
	Queso fresco y semicurado	Oxidación, cristalización lactosa y crecimiento microbiano.	Rancidez, textura arenosa, producción mohos.
	Yogurt	Sinéresis y oxidación.	Separación del suero y rancidez.
DETERIORO EN PRODUCTOS DE LA PESCA FRESCOS Generalmente puede observarse crecimiento bacteriano, oxidación, reblandecimiento de la carne, cambios de coloración.	Pescado fresco	Crecimiento microbiano y reacciones químicas	Pérdida de firmeza de la carne, opacidad de la córnea, olores y sabores desagradables (sulfuro, amoniaco), pérdida de piel o escamas, mucus lechoso-opaco superficial.
	Marisco fresco	Crecimiento microbiano y reacciones químicas	Pérdida de firmeza de la carne, olores y sabores desagradables (sulfuro, amoniaco), mucus lechoso-opaco superficial, cambios de coloración (melanosis).

Fuente: Basada en Kilcast y Subramaniam, 2000; Steele, 2004.

5. FACTORES QUE AFECTAN A LA VIDA ÚTIL: factores intrínsecos y extrínsecos.

Existen múltiples factores que pueden afectar a la vida útil de un alimento. De forma general, estos factores pueden clasificarse como intrínsecos y extrínsecos. Los **factores intrínsecos** son los factores propios del alimento, es decir, aquellas características inherentes a la composición de los mismos, como por ejemplo ingredientes (concentración de conservantes, contenido en sal), pH, actividad de agua (a_w), microbiota asociada y barreras estructurales.

Los **factores extrínsecos** son los que no dependen del propio alimento, como por ejemplo la temperatura de conservación (T^a), la humedad relativa (HR), condiciones de envasado y el procesado del producto (incluida la posibilidad de recontaminación).

Las características del producto final van a condicionar el que se puedan desarrollar o no los mecanismos de deterioro o pérdida de seguridad a lo largo de la vida útil. Así, por ejemplo, en el deterioro microbiológico podremos observar que, para cada microorganismo, bajo una serie de condiciones de crecimiento, existe un valor máximo y mínimo de cada parámetro en el que éste puede crecer (T^a , pH, actividad de agua etc.). Al factor que ejerce un efecto adverso directamente sobre el crecimiento microbiano, impidiendo por sí solo su crecimiento, se le conoce como **factor limitante**. En otros casos, será la acción sinérgica de dos o más factores la que conseguirá limitar el crecimiento del microorganismo. Estos factores pueden ser, en ocasiones, puntos críticos de control o prerrequisitos operativos que requieren ser vigilados y verificados en el contexto del sistema APPCC.

Las figuras 1 y 2 describen brevemente los principales factores intrínsecos y extrínsecos que pueden afectar a la vida útil en relación con el crecimiento de microorganismos y deterioro del alimento.



Figura 1. Principales factores intrínsecos que pueden afectar a la vida útil en relación con el crecimiento microbiano.

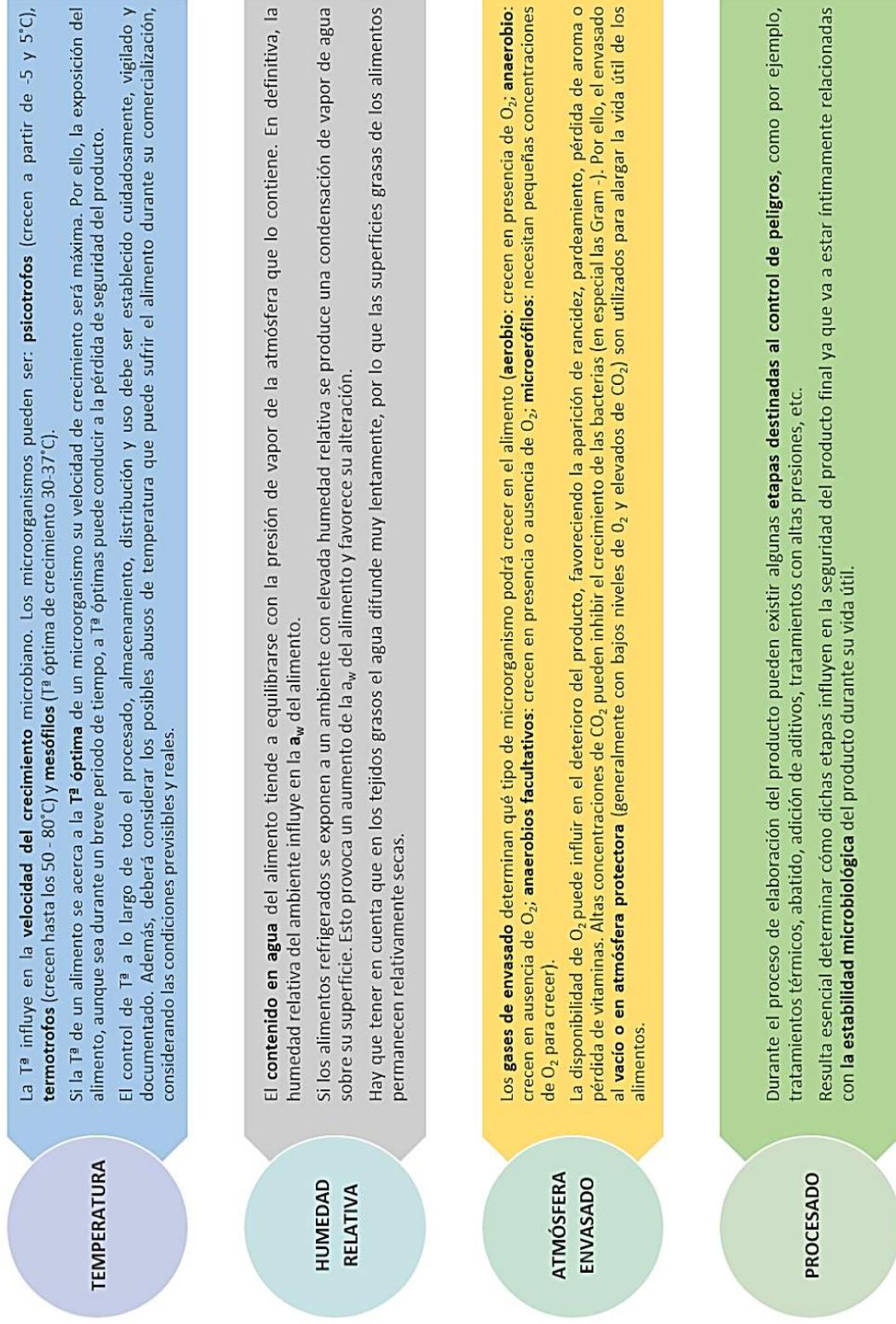


Figura 2. Principales factores extrínsecos que pueden afectar a la vida útil en relación con el crecimiento microbiano.

6. DIFERENCIAS ENTRE FECHA DE CONSUMO PREFERENTE Y FECHA DE CADUCIDAD.

El Reglamento (CE) N° 178/2002, define como **alimento no seguro** a los alimentos nocivos y los no aptos para el consumo. Por ello, para que un alimento se considere seguro, se deben de tener en cuenta ambos conceptos: inocuidad y aptitud para el consumo.

De acuerdo a lo establecido en el *Codex Alimentarius*, la **inocuidad** de un alimento es la garantía de que éste no causará daño al consumidor cuando sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso al que se destine. Así, se considera que dicho alimento no contiene ningún peligro en niveles inadmisibles, como bacterias patógenas, toxinas o metabolitos, por lo que no producirá enfermedad en el consumidor (ni a corto ni a largo plazo).

La **aptitud** de los alimentos es el conjunto de cualidades que hacen aceptables los alimentos a los consumidores, es decir, aptos para el consumo humano al no estar putrefactos, deteriorados, descompuestos o contaminados por materias extrañas.

Por otra parte, el concepto de **calidad** abarca atributos que influyen en el valor de aceptación de un producto para el consumidor como origen, color, aroma, textura y métodos de elaboración de los alimentos.

El Reglamento (UE) N° 1169/2011 sobre información alimentaria facilitada al consumidor, establece que *"en el caso de alimentos microbiológicamente **muy perecederos** y que por ello puedan suponer un **peligro inmediato** para la salud humana después de un corto período de tiempo, la fecha de duración mínima se cambiará por la **fecha de caducidad**. Después de su «fecha de caducidad», el alimento no se considerará seguro de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 14, apartados 2 a 5, del Reglamento (CE) No 178/2002."* Este es el caso de aquellos alimentos listos para el consumo en los que *L. monocytogenes* puede estar presente y crecer en el alimento durante su vida útil.

Sin embargo, hay alimentos, como por ejemplo las carnes y pescados frescos que, siendo muy perecederos desde el punto de vista microbiológico, su deterioro no tiene por qué suponer un peligro inmediato para la salud por tratarse de un rápido deterioro de sus características organolépticas, causado principalmente por el crecimiento de bacterias alterantes. Debido al rápido deterioro es razonable marcar estos alimentos con fecha de caducidad para, de esa manera, evitar la puesta en el mercado de productos no seguros por ser inaceptables para el consumo por estar deteriorados, descompuestos o putrefactos.

La **fecha de consumo preferente**, hace referencia a la calidad organoléptica del alimento. Éste podría consumirse una vez transcurrida la fecha de consumo preferente sin que produzca enfermedad en el consumidor siempre y cuando el

alimento no haya alcanzado un grado de deterioro que lo convierta en no apto para el consumo (ejemplo alimentos enmohecidos o enranciados). Por ello, el consumo preferente debe marcarse en productos que, por sus características intrínsecas y/o extrínsecas, no permiten el crecimiento de patógenos ni la producción de toxinas o metabolitos y en productos que no permiten el rápido crecimiento de microorganismos alterantes que den lugar a productos no aptos para el consumo. La alteración de los productos marcados con fecha de consumo preferente tiene lugar lentamente (Figura 3).

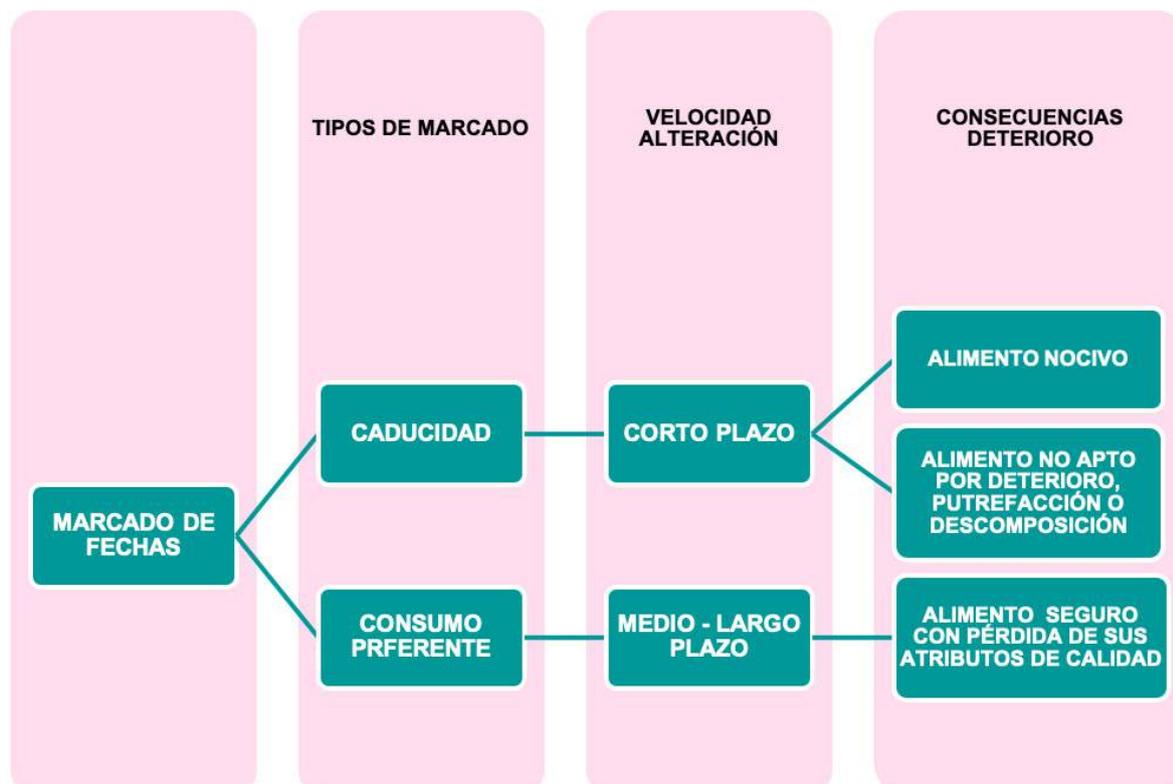


Figura 3. Diferencias entre fecha de caducidad y consumo preferente.

La fecha de consumo preferente se usa habitualmente en alimentos congelados y en no perecederos que son estables a temperatura ambiente. Poseen una vida útil prolongada, desde varios meses hasta años. Algunos ejemplos son: granos de cereal y nueces o semillas, productos procesados preservados por esterilización, deshidratación, etc.

No obstante, algunos alimentos pueden requerir refrigeración para mantener su calidad organoléptica durante un periodo más prolongado. En estos casos, el fin de la vida útil está determinado por la pérdida de atributos de calidad, que se determinan con el fin de que al consumidor llegue un producto que ofrezca unas características de calidad específicas. En estas situaciones, el fin de la vida útil está normalmente lejos de que el alimento presente un deterioro que lo haga no seguro según la definición del Reglamento (CE) N° 178/2002. En estos casos, el marcado de fechas debería realizarse mediante la mención "consumo preferente" de manera que se evite el desperdicio innecesario de alimentos.

En el apartado 8.3 de esta guía se incluye un árbol de decisiones para ayudar a decidir el tipo de marcado de fechas.

El anexo I muestra ejemplos de posibles alimentos con marcado de fecha de caducidad y consumo preferente.

7. PELIGROS A CONSIDERAR DURANTE LA VIDA ÚTIL DE PRODUCTOS CONSERVADOS EN REFRIGERACIÓN.

Los principales peligros que pueden generarse durante la vida útil de los alimentos conservados en refrigeración son aquellos derivados del crecimiento de bacterias psicótrofas, incluyendo bacterias patógenas, no patógenas, productoras de toxinas y/o metabolitos tóxicos.

Los principales peligros asociados a la pérdida de inocuidad de los alimentos refrigerados son:

- *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo que puedan favorecer su crecimiento.
- Histamina en productos de la pesca asociados a un alto contenido en histidina.
- *Clotridium botulinum* no proteolítico en alimentos envasados al vacío y en atmósferas modificadas con baja concentración de O₂.

Otros peligros asociados a los alimentos refrigerados que el operador alimentario podrá considerar, en su caso, son:

- *Yersinia enterocolítica*
- Cepas psicótrofas de *Bacillus cereus*

Es importante que estos peligros sean considerados en el estudio de vida útil si el operador alimentario puede razonablemente prever que algunos de ellos pueden estar en el producto al final del procesado y si las condiciones de almacenamiento y la duración de la vida útil pueden dar lugar a un crecimiento o formación de toxina/metabolito hasta niveles inaceptables.

En relación a *Y. enterocolítica* y *B. cereus*, la bibliografía consultada reporta datos contradictorios. Así, varios estudios indican que la vida útil no es una medida eficaz para controlar el riesgo de *Y. enterocolítica* en productos alimenticios, siendo las buenas prácticas de higiene y manipulación la medida de control más relevante para el control de dicho peligro. Por otro lado, las cepas patógenas de *B. cereus* no crecen por debajo de 10 °C, por lo que un adecuado mantenimiento de la cadena de frío permitiría controlar este peligro en productos refrigerados.

Por todo ello, estos peligros no han sido considerados en esta guía, aunque sí deberán contemplarse en los estudios de vida útil en aquellos casos en que los operadores alimentarios determinen que estos peligros son relevantes para su producto y en los casos en que los datos científicos y epidemiológicos pongan de

manifiesto que es necesario su inclusión.

El Anexo II de este documento describe las características de crecimiento y medidas de control más relevantes de estos peligros.

8. ETAPAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL.

Debido a las múltiples causas de alteración de los alimentos, la interacción entre ellas y la enorme variedad de alimentos, no se puede dar una única respuesta en cuanto a la metodología a seguir para estimar, establecer y validar la vida útil de cada alimento. La propuesta de esta guía puede ser usada por el operador alimentario para justificar el marcado de fechas y la vida útil estimada. Sin embargo, pueden ser igualmente válidos otros enfoques y metodologías siempre que se ajusten a la legislación vigente y justifiquen la vida útil establecida.

Para garantizar la viabilidad del estudio, todos los procesos deben estar estandarizados con el fin de reducir al máximo las posibles variaciones de dichas características entre diferentes lotes. En cualquier caso, siempre debe considerarse en el estudio la variabilidad de los productos y tener en cuenta las características más desfavorables que representen al lote.

La figura 4 representa una propuesta de las principales etapas a seguir para establecer y validar la vida útil de los alimentos.



Figura 4. Descripción de las etapas a seguir para establecer y validar la vida útil de los alimentos.

8.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y DEL PROCESO.

Se ha de llevar a cabo una descripción completa del producto y/o familia de productos y del proceso que incluya e identifique los factores extrínsecos e intrínsecos que caracterizan el alimento y que van a determinar el tipo de deterioro que va a experimentar durante su vida útil.

Por ello, es fundamental realizar una descripción detallada de los factores más relevantes del producto alimenticio objeto del estudio, prestando especial atención a aquellos que puedan actuar como **factor/es limitante/s del crecimiento o producción del peligro** (a_w , pH, concentración de sal, concentración de conservantes, sistema de envasado, T^a de conservación etc.), bien por sí mismo o como una combinación de varios factores. Normalmente es necesario vigilar y verificar de forma periódica los factores limitantes dentro del marco del sistema APPCC.

A continuación se describe un modelo de ficha descriptiva de producto a cumplimentar por la empresa y que recogerá los datos básicos sobre los factores intrínsecos y extrínsecos del producto (Figura 5).

NOMBRE DEL PRODUCTO (o grupo de productos)	Nº Revisión:
Fecha última revisión:	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ INGREDIENTES: Materias primas, aditivos, especias, etc. ▪ CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO: Color, aspecto, olor, sabor y textura. ▪ CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL: pH, a_w, contenido en sal, concentración de conservantes, humedad, estructura (sólido, líquido). ▪ ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO: Procesos tecnológicos aplicados, y parámetros de importancia en la seguridad del alimento (PCCs, RHOs, ...). ▪ CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS: Identificar los criterios microbiológicos de higiene regulados en el Reglamento (CE) No 2073/2005 que sean aplicables al producto. ▪ CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD: Identificar los criterios microbiológicos de seguridad regulados en el Reglamento (CE) No 2073/2005 y sean aplicables al producto. ▪ OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO: Identificar otros microorganismos relevantes que puedan afectar a la seguridad del producto. ▪ PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE: Material empleado en el envasado, tecnología empleada (al vacío, en atmósfera protectora, etc.) presentaciones, formatos y cantidad por formato. ▪ ETIQUETADO: declaración de propiedad nutricional y/o saludable. ▪ CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN: Aspectos a considerar para la correcta conservación del producto durante su almacenamiento y distribución hasta su consumo. ▪ CONDICIONES DE USO Y MANTENIMIENTO: Aspectos a considerar por el consumidor a la hora de utilizarlo y mantenerlo: consumo directo, previo calentamiento, descongelar, tipo de conservación una vez abierto el envase: conservar en refrigeración máximo 2 días, sacar 10 minutos antes del frigorífico, retirar la cobertura, etc. ▪ POBLACIÓN DESTINO: Población en general o destinada para algún grupo especial como hipertensos, diabéticos, celíacos, otras industrias de transformación, etc. 	

Figura 5. Modelo de ficha descriptiva.

A la hora de abordar el estudio es necesario considerar la posible evolución de las características del producto a lo largo de su vida útil, como por ejemplo el pH y la a_w , ya que, en algunos casos, las modificaciones de estos factores pueden favorecer el desarrollo de microorganismos alterantes, patógenos y/o producción de toxinas o metabolitos.

8.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD.

El objetivo de esta etapa será, teniendo en cuenta los factores extrínsecos e intrínsecos del producto, identificar la/s causa/s que vayan a limitar su vida útil, bien por la pérdida de sus atributos de calidad o por la pérdida de seguridad. En unos casos consistirá en identificar **qué microorganismo/s patógeno/s o sus toxinas/metabolitos** pueden razonablemente estar presentes y alcanzar niveles inaceptables en el producto durante su vida útil y en otros consistirá en definir los mecanismos de alteración y/o deterioro que va a experimentar el producto.

Para identificar las causas probables de pérdida de seguridad deberá tener en cuenta la información epidemiológica disponible y las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso por parte del consumidor.

Existen diversas herramientas que permiten investigar la capacidad de crecimiento de los microorganismos patógenos asociados a la vida útil. Algunas de ellas son:

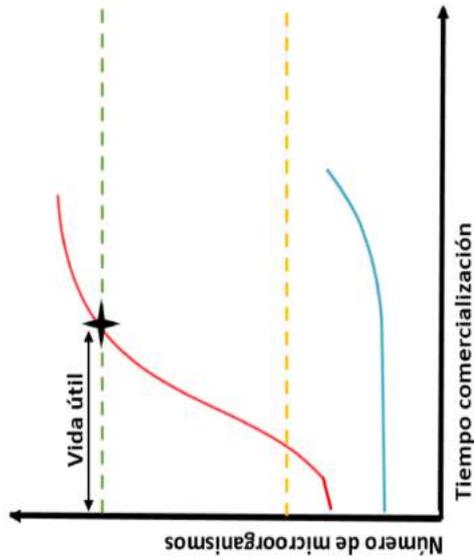
- Literatura científica
- Legislación
- Microbiología predictiva
- Ensayo de desafío

Es necesario que el operador cuente con un sistema de autocontrol implantado en el que los procesos y medidas de control estén validados y estandarizados, de manera que, en el caso de etapas en las que se eliminan peligros relevantes para la determinación de la vida útil, se garantice su eficacia.

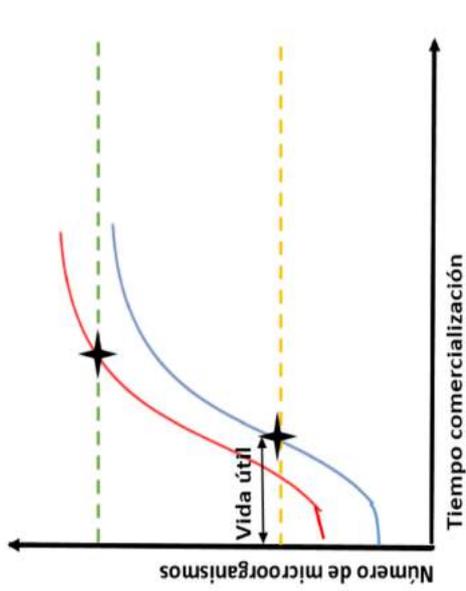
Algunos alimentos permiten el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes. Sin embargo, en algunos casos, el crecimiento de estos últimos da lugar a alteraciones organolépticas que los hace no aptos para el consumo antes de que los patógenos alcancen niveles inaceptables. Por ello, en estos casos la vida útil estará condicionada por el deterioro organoléptico del producto (Figura 6; Escenario A). En otros casos, los patógenos, sus metabolitos o toxinas, como por ejemplo la histamina, podrían alcanzar niveles inaceptables antes de que éstos muestren signos de alteración (Figura 6; Escenario B). Por ello, la vida útil de estos productos deberá ser establecida en base al crecimiento de patógenos y/o producción de toxinas o metabólicos.

Otros alimentos, debido a sus características, no permiten el crecimiento de microorganismos patógenos. Sin embargo, sí pueden darse otros mecanismos de alteración o deterioro que van a limitar la vida útil del producto (Figura 6; Escenario C).

ESCENARIO A. El alimento muestra signos de alteración organoléptica antes de que los microorganismos patógenos alcancen niveles inaceptables



ESCENARIO B. Los patógenos alcanzan niveles inaceptables antes de que el producto muestre signos de alteración



ESCENARIO C. El alimento muestra signos de alteración organoléptica a medio-largo plazo pero continúa siendo inocuo.

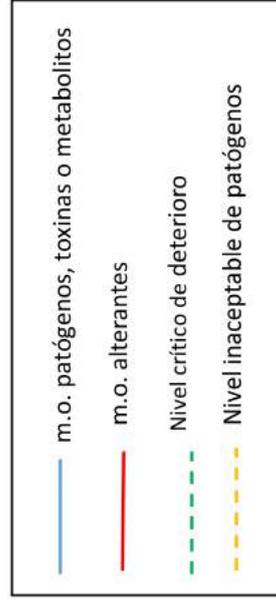
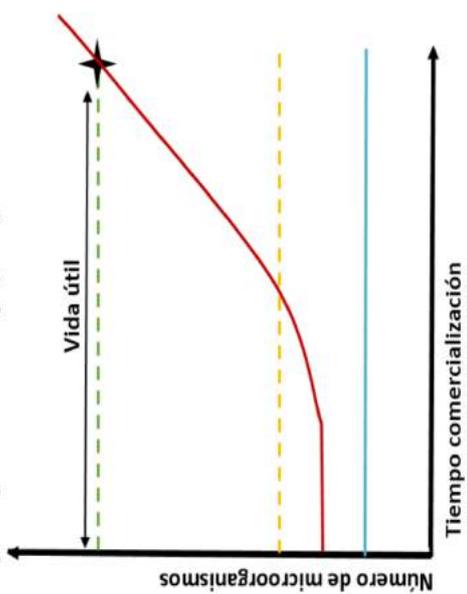


Figura 6. Representación de los escenarios que pueden darse durante la vida útil de los alimentos. Basado en documento guía: How to Determine the shelf Life of Food. A Guidance Document. 22 July 2014. New Zealand Government

8.3. DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O FECHA DE CONSUMO PREFERENTE.

La figura 7 representa un árbol de decisiones que orientará al operador económico en la toma de decisiones sobre el marcado de fechas. Para el uso del árbol de decisiones deberá tenerse en cuenta las causas probables de pérdida de seguridad del producto identificadas en la etapa anterior.

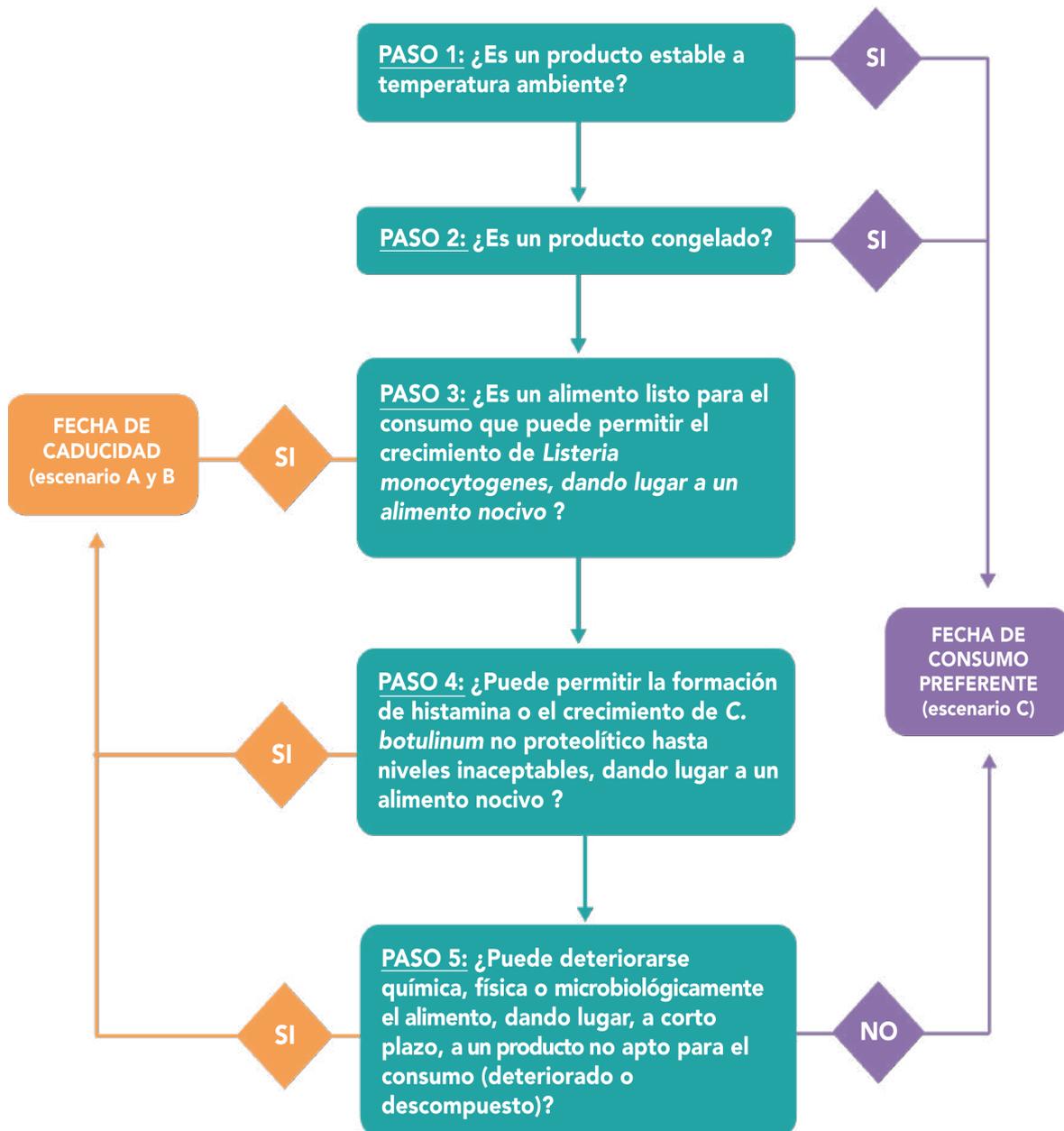


Figura 7. Árbol de decisiones para el marcado de fechas en los productos alimenticios.

PASO 1: Los productos estables a temperatura ambiente no permiten el crecimiento de patógenos y las alteraciones organolépticas que pueden experimentar se suelen desarrollar lentamente. Los alimentos que se hayan sometido a un procesado capaz de destruir microorganismos vegetativos y sus esporas, sin posibilidad de re-contaminación, pueden dar lugar a productos estables a temperatura ambiente, como por ejemplo la leche UHT y las conservas. Otro tipo de alimentos en los que se dan estas condiciones son aquellos con baja actividad de agua, muy ácidos o con alto contenido en azúcar y/o sal. Algunos ejemplos son la pasta seca, galletas, cereales, encurtidos, etc. Por ello, en estos casos procede marcar la vida útil con la mención **“fecha de consumo preferente”**.

PASO 2: La congelación de los alimentos inhibe el crecimiento de los microorganismos, tanto patógenos como alterantes. Las reacciones de deterioro que experimentan son lentas, como por ejemplo, enranciamiento y quemaduras por el frío, por lo que procede marcar la vida útil con la mención **“fecha de consumo preferente”**. En aquellos casos en los que el operador alimentario informe de la vida útil del producto una vez descongelado, deberá pasar al paso 3 para continuar en la toma de decisiones sobre la mención a utilizar para informar de la vida útil.

PASO 3: Los alimentos listos para el consumo no van a sufrir ningún tratamiento térmico, como el cocinado u otros, que permitan eliminar o reducir a un nivel aceptable el peligro *L. monocytogenes*. Por ello, en aquellos casos en que el alimento permita el crecimiento de *L. monocytogenes*, y éste sea relevante para el producto, procederá marcar la vida útil con la mención **“fecha de caducidad”**.

A este respecto, el Reglamento (CE) No 2073/2005 define los factores que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo. Del mismo modo, también describe los productos que están exentos de realizar pruebas regulares de *L. monocytogenes* y, por lo tanto, no sería necesario que consideren *L. monocytogenes* para determinar la vida útil. Un ejemplo de ello serían los alimentos que se sometían a un tratamiento térmico listericida en el envase final sin posibilidad de recontaminación posterior. Algunos ejemplos de productos en los que normalmente procedería marcar fecha de caducidad por crecimiento de *L. monocytogenes* son pescado ahumado en frío, jamón cocido loncheado, etc.

PASO 4: Aquellos productos no listos para el consumo o los listos para el consumo que no pueden favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* en los que se haya determinado que histamina o *C. botulinum* no proteolítico son relevantes y permitan su crecimiento y/o formación hasta niveles inaceptables, procederá marcar la vida útil con la mención **“fecha de caducidad”**. Algunos ejemplos son pescado fresco, perteneciente a familias de pescado asociadas a un alto contenido en histidina, o alimentos envasados al vacío que no hayan sufrido ninguna medida de control eficaz para eliminar *C. botulinum* no proteolítico.

PASO 5: Algunos productos experimentan un rápido deterioro organoléptico causado por el crecimiento de microorganismos alterantes, sin que necesariamente

haya un crecimiento de microorganismos patógenos hasta niveles significativos. En estos casos, se recomienda marcar la vida útil con la mención “fecha de caducidad”. Algunos ejemplos son las carnes frescas, la pasta fresca y hortalizas troceadas no listas para el consumo. Sin embargo, cuando el deterioro o la pérdida de calidad que experimenten consista en un proceso lento, la vida útil debería indicarse con la mención de “fecha de consumo preferente”. Algunos ejemplos son los productos cárnicos de baja actividad de agua como el jamón serrano loncheado, y el queso curado.

8.4. VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL: HERRAMIENTAS.

El presente apartado tiene como objeto describir las principales herramientas a utilizar para validar la vida útil de aquellos productos en los que proceda informar al consumidor sobre su vida útil mediante la mención “fecha de caducidad”. Si bien algunas de estas herramientas podrían ser aplicables en el caso de productos en los que proceda marcar con “fecha de consumo preferente” la vida útil, es conveniente que, en estos casos, el operador alimentario tenga en cuenta que la descripción de las herramientas realizada a continuación está dirigida a estudios de vida útil para el marcado de fechas de caducidad.

Para establecer la fecha de caducidad de un alimento el operador alimentario podrá emplear una o varias de las siguientes herramientas:

1. Características físico-químicas.
2. Literatura científica.
3. Histórico de datos.
4. Estudios complementarios:
 - A. Análisis sensorial.
 - B. Modelos matemáticos: microbiología predictiva.
 - C. Análisis laboratoriales:
 - i. Análisis de microorganismos indicadores de alteración.
 - ii. Estudios de durabilidad.
 - iii. Ensayos de desafío (*Challenge test*).
 - iv. Indicadores físico-químicos de deterioro en productos de la pesca frescos.

Estas herramientas deberán estar dirigidas al estudio de las causas identificadas, en etapas anteriores, como posibles limitantes de la vida útil del producto. En la elección de las herramientas deberá tenerse en consideración el riesgo asociado al alimento que dependerá, entre otros, del uso previsto, población de destino, los tratamientos recibidos, las materias primas utilizadas o la información epidemiológica disponible. Será necesario llevar a cabo estudios complementarios en los casos en los que las características físico-químicas, la literatura científica y/o el histórico de datos no sean suficientes y adecuados para justificar la vida útil establecida.

Para llevar a cabo el estudio de vida útil deberán tenerse en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de almacenamiento, distribución y uso del producto por parte del consumidor. El operador alimentario debe justificar y documentar las temperaturas utilizadas en el estudio. Se recomienda dividir el tiempo de almacenamiento en tres etapas, distribución (desde fábrica al expositor), exposición en minorista y almacenamiento por el consumidor final. Del mismo modo, es necesario estimar qué duración va a tener cada una de estas tres etapas.

La EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (versión 3, modificada 21/2/2019), establece que, para ensayos de desafío y durabilidad y ante desconocimiento de las temperaturas del alimento durante su comercialización, el operador alimentario podrá utilizar en sus estudios las combinaciones de tiempo – temperatura descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Temperatura y duración de cada etapa de la cadena de distribución de alimentos.

Etapa de la cadena	Temperatura			Duración de la etapa			
				Vida útil ≤ 21 días		Vida útil > 21 días	
Desde la fábrica hasta la llegada al expositor de venta	Justificada por información detallada*	O si no se conoce	7°C	Justificada por información detallada*	Ó si no se conoce	1/3 de la vida útil total estimada	7 días
Minorista: expositor de venta	Justificada por información detallada**	O si no se conoce	7°C	Justificada por información detallada*	Ó si no se conoce	1/3 de la vida útil total estimada	½ (vida útil – 7 días)
Conservación por el consumidor	Justificada por información detallada**	O si no se conoce	12°C	Justificada por información detallada*	Ó si no se conoce	1/3 de la vida útil total estimada	½ (vida útil – 7 días)

Temperatura justificada por información detallada:

**El percentil 95 de la observación de datos propios obtenidos por la empresa.*

***El percentil 95 de las observaciones del país donde se localiza la etapa de la cadena de frío en consideración.*

Esta misma guía técnica indica que, para la etapa en fábrica hasta la llegada al minorista, son preferibles los propios datos del operador alimentario. Para la segunda etapa en minorista y tercera en consumidor, también recomienda usar datos nacionales, usando el percentil 95 de los datos observados. Un estudio realizado en nuestro país sobre temperaturas durante el almacenamiento doméstico

da como resultado de percentil 95 una temperatura de 9,5°C, de manera que es posible utilizar este dato.

También, el documento *“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”*, establece que si las temperaturas de almacenamiento no se conocen para el producto en cuestión, el operador alimentario puede usar por ejemplo temperaturas 8-12 °C para el almacenamiento en los estudios de vida útil.

La reproducibilidad y la exactitud del estudio pueden verse afectados por las características del producto, de sus materias primas, condiciones de distribución, etc. Por ello, una vez concluido el estudio de vida útil es necesario aplicar un margen de seguridad a la vida útil estimada. Para establecer el margen de seguridad deberá tenerse en cuenta la reproducibilidad de los datos obtenidos durante el estudio de vida útil.

Las figuras 8, 9 y 10 ofrecen información orientativa sobre la/s herramienta/s a emplear según el peligro relevante para el alimento.

LISTERIA MONOCYTOGENES

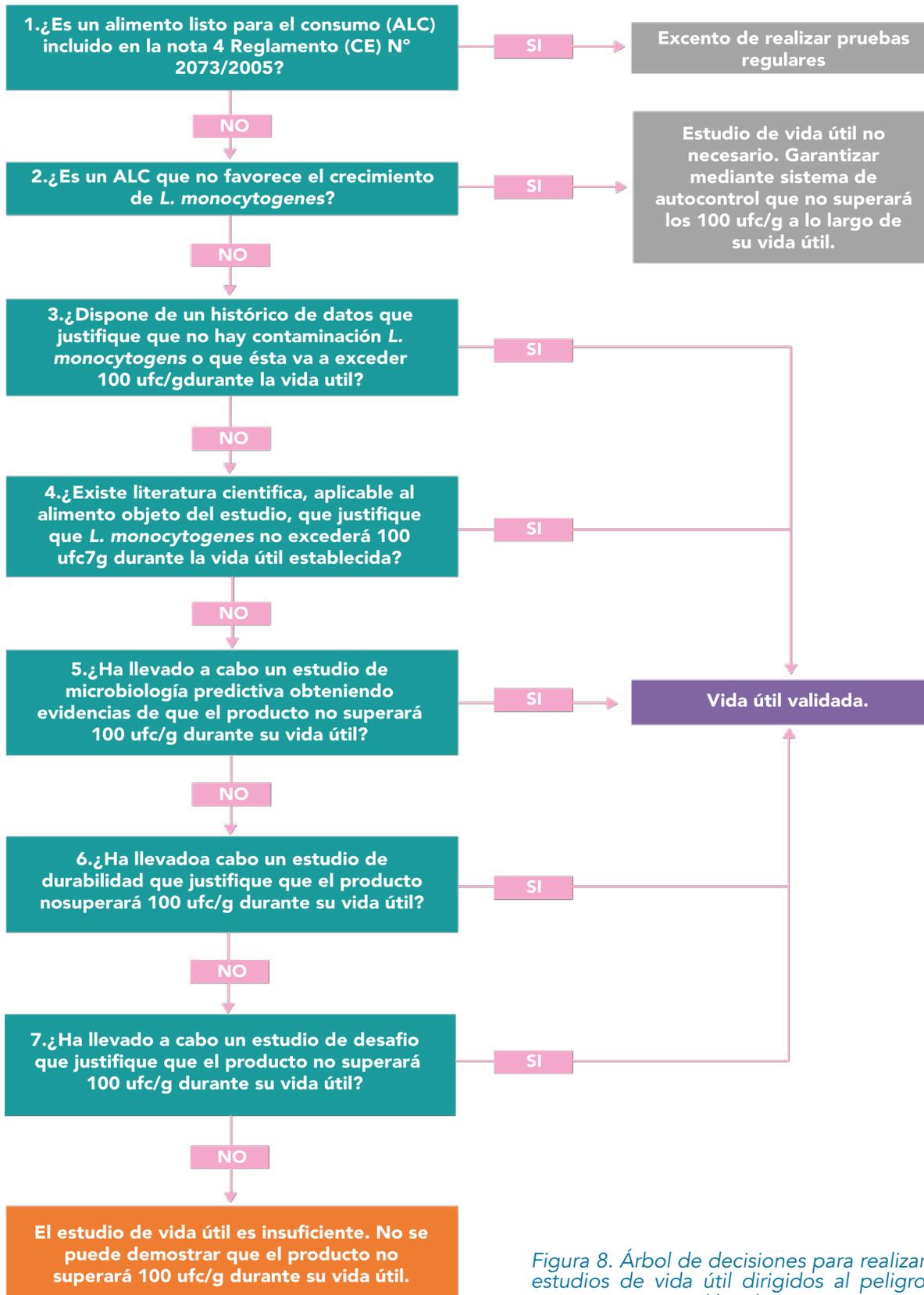


Figura 8. Árbol de decisiones para realizar estudios de vida útil dirigidos al peligro *Listeria monocytogenes*

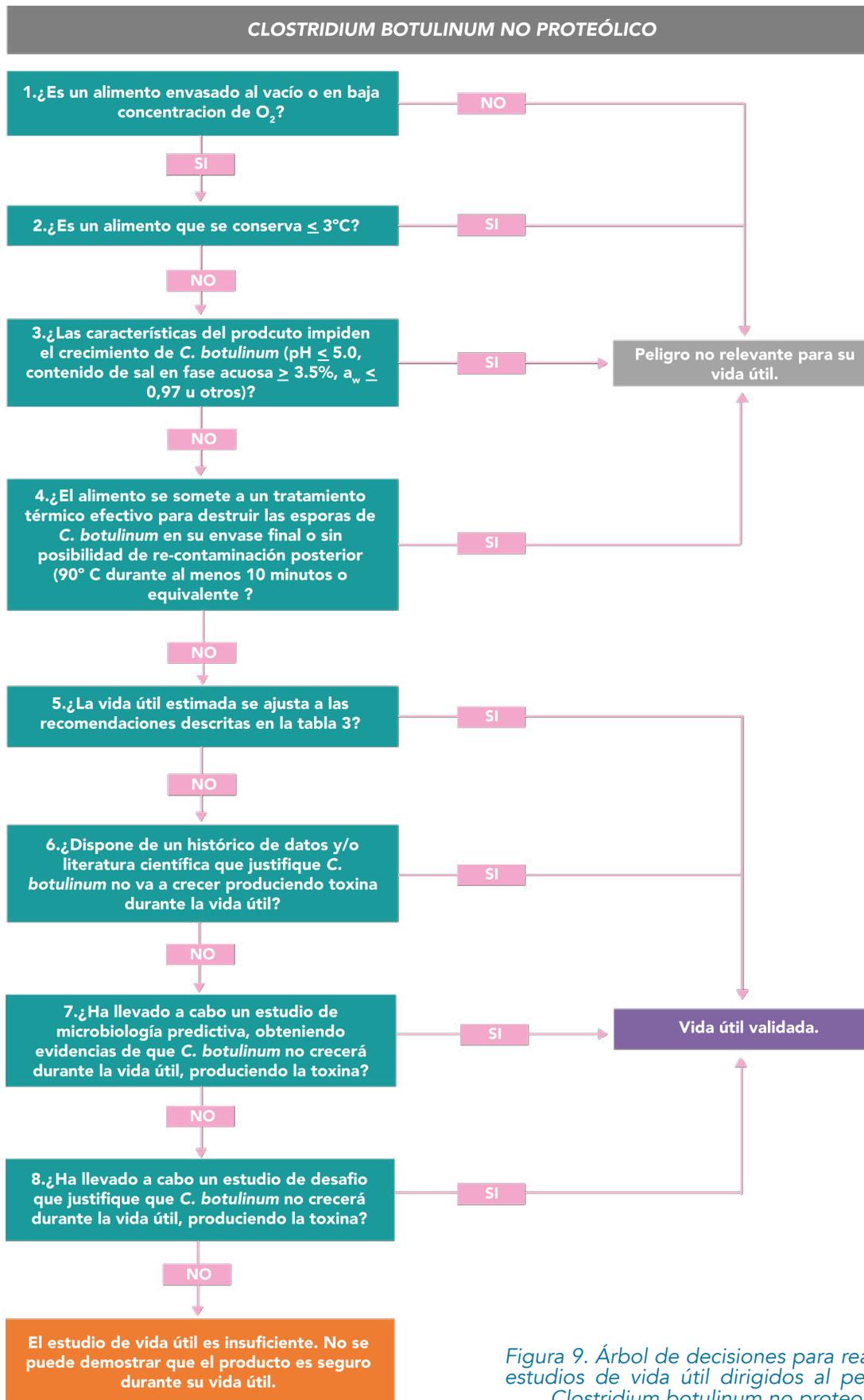


Figura 9. Árbol de decisiones para realizar estudios de vida útil dirigidos al peligro Clostridium botulinum no proteolítico

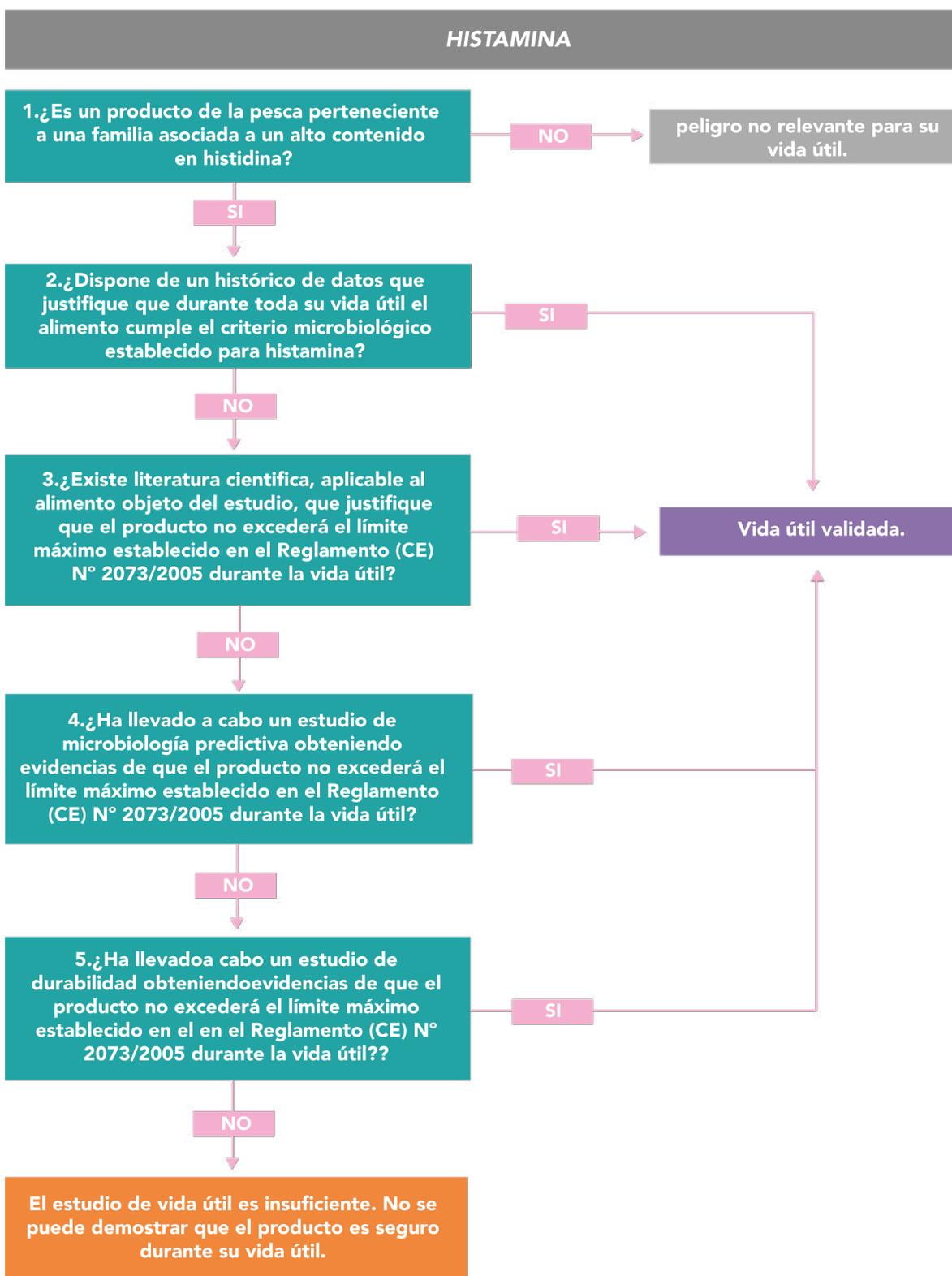


Figura 10. Árbol de decisiones para realizar estudios de vida útil dirigidos al peligro histamina.

8.4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.

En algunos productos, las características físico-químicas del alimento pueden ser suficientes, por sí mismas, para justificar la vida útil establecida para el producto. Así, en los casos en los que, comparando las características físico-químicas del producto con la bibliografía científica pueda demostrarse que el peligro no puede desarrollarse en el producto, sería suficiente para validar y establecer la vida útil del producto en relación con dicho peligro.

Resulta conveniente considerar la variabilidad de las mediciones realizadas, como por ejemplo, realizando el cálculo de los valores medios obtenidos, desviación estándar e intervalos de confianza.

Para ello, se puede utilizar la calculadora desarrollada por la red BIOQURA disponible en internet (<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>) que, introduciendo los valores medios de pH y/o a_w , desviación estándar y número de muestras analizadas permite conocer el porcentaje de unidades que presentan un pH o a_w superior al admisible por permitir el crecimiento del microorganismo. Así, por ejemplo, en el caso de *L. monocytogenes*, nos indicaría la proporción de muestras que presentan un pH > 4.4 o una a_w > 0.92.

De este modo, las características físico-químicas se considerarían evidencia suficiente para demostrar de manera satisfactoria que el producto no favorece el desarrollo del peligro si por ejemplo, el porcentaje calculado por dicha herramienta es inferior al 5%.

En el caso de productos compuestos de varios ingredientes no mezclados de manera homogénea, se deberán considerar las características físico-químicas por separado o las del ingrediente que presente unas características más desfavorables.

8.4.2. LITERATURA CIENTÍFICA.

El operador alimentario podrá utilizar estudios científicos o guías publicadas por fuentes fiables como herramientas para determinar la vida útil de sus productos. En muchos casos, la literatura científica puede dar información sobre el crecimiento o formación de los principales peligros a considerar durante la vida útil.

Por ejemplo, existen recomendaciones para establecer una vida útil con un máximo de 10 días en determinados productos refrigerados, entre 3° y 8 °C, envasados al vacío o en atmósfera modificada cuando no se hayan aplicado medidas de control para *C. botulinum* no proteolítico.

La tabla 3 resume algunas recomendaciones para establecer la vida útil de alimentos envasados al vacío o en atmósferas modificadas en relación con *C. botulinum*.

Tabla 3. Recomendaciones para establecer la vida útil de productos refrigerados envasados al vacío o en atmósfera modificada.

Tª máxima de almacenamiento y vida útil recomendada	Fuente
Almacenamiento a Tª 3 - 8 °C; vida útil ≤ 10 días	FSA, 2017
Carne fresca de vacuno: Almacenamiento a Tª ≤ 8-10 °C; vida útil ≤ 23 días	Peck y col., 2019
Carne fresca de cordero: Almacenamiento a Tª ≤ 8-10 °C; vida útil ≤ 27 días	
Carne fresca de porcino: Almacenamiento a Tª ≤ 8-10 °C; vida útil ≤ 18 días	

Es importante señalar que, para poder emplear la literatura científica como herramienta para determinar la vida útil de un producto, las características definidas en el estudio (a_w , pH, procesado, etc.) deberán corresponderse con las definidas en el producto alimenticio objeto del estudio. En cualquier caso, la extrapolación de los resultados indicados en la literatura científica debe realizarse con precaución, debiendo siempre justificar la equivalencia de ambos productos y procesos de elaboración. El operador económico deberá determinar y justificar si las diferencias respecto a las condiciones en las que se ha desarrollado el estudio son o no significativas en relación al crecimiento o formación del peligro relevante para la vida útil.

Las tablas 4 y 5 resumen los resultados obtenidos por varios estudios basados en ensayos de desafío y microbiología predictiva, llevados a cabo sobre diferentes productos con el fin de evaluar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y la formación de histamina.

Tabla 4. Resultados de test de desafío para evaluar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* sobre diferentes productos.

Producto	Características intrínsecas		Perfil de temperatura	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	pH	a_w		Potencial de crecimiento ($\delta > 0.5 \log$)	Concentración final (log ufc/g)
Ensalada de col	5.49 ± 0.465	0.985 ± 0.001	8°C durante 7 días y 12°C durante 14 días	NO	No detectado
Queso feta	4.58 ± 0.155	0.945 ± 0.018	8°C durante 14 días	NO	No detectado
Queso de cabra	4.32 ± 0.058	0.986 ± 0.004	8°C durante 14 días	NO	No detectado

Fuente: Hunt y col. (2018).

Tabla 5. Estimación de vida útil de productos de la pesca mediante microbiología predictiva considerando *L. monocytogenes* e histamina.

Producto	Características intrínsecas			Atmósfera envasado	Temperatura	Peligro estudiado	Vida útil estimada
	pH	Contenido de sal en fase acuosa	Concentración histidina				
Productos de la pesca	6.5	1%	10750 ppm	0% CO ₂	3°C	Histamina	6 días
				20% CO ₂			7 días
				40% CO ₂			8 días
Ptos. de la pesca listos para el consumo	6.5	1%	No relevante	0% CO ₂	0 - 7 °C	<i>Listeria monocytogenes</i> (concentración inicial 1 ufc/g)	11 días
				20% CO ₂			14 días
				40% CO ₂			18 días

Fuente: EFSA, 2015.

8.4.3. HISTÓRICO DE DATOS

Un histórico de datos es una herramienta básica para determinar la vida útil de los alimentos. El histórico de datos generados durante un periodo de tiempo puede emplearse para realizar un análisis de tendencias que aporte información sobre la tendencia microbiológica y físico-química del producto.

Los datos que pueden contribuir al estudio de vida útil son:

- Análisis de superficies y/o de materias primas y/o productos intermedios: dan información sobre la contaminación existente en el ambiente de producción o la calidad microbiológica de los ingredientes empleados.
- Histórico de controles de los factores intrínsecos y extrínsecos del producto: a_w , pH, concentración de sal, concentración de aditivos, % CO₂ en envasados al vacío, etc.
- Reclamaciones: en los alimentos en los que la vida útil esté condicionada por el deterioro organoléptico, la ausencia de reclamaciones puede ser suficiente para verificar que la vida útil establecida es adecuada.
- Resultados de los análisis de producto: los análisis del producto final aportan información sobre su calidad microbiológica y la eficacia de las medidas de control implantadas. Estos análisis deberían realizarse al final de la vida útil y teniendo en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de almacenamiento, distribución y uso. De esta manera, la fiabilidad del histórico de datos será mayor para justificar la vida útil.

La fiabilidad del histórico de datos depende en gran medida de la cantidad de datos recopilados. Así, existen diversas herramientas estadísticas que permiten evaluar la consistencia del histórico de resultados analíticos. La red BIOQURA ha desarrollado una herramienta, disponible en internet (<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>),

que permite calcular el límite superior del intervalo de confianza, considerando un nivel de confianza determinado que generalmente suele oscilar entre el 95 % - 99%. De este modo, introduciendo el número de muestras positivas respecto a la totalidad de muestras analizadas, la herramienta calcula de forma sencilla el intervalo de confianza de dichos datos. En la toma de decisiones sobre la fiabilidad del histórico de datos se recomienda que el límite superior del intervalo de confianza sea igual o inferior a 0.05, asumiendo un nivel de confianza del 95%. En estos casos el histórico de datos podrá ser suficiente por sí mismo para establecer la vida útil de forma segura.

La tabla 6 muestra el límite superior del intervalo de confianza obtenido ante diferentes planes de muestreo, considerando el número total de muestras analizadas y el número de muestras positivas, asumiendo un nivel de confianza del 95%. Así, tal y como puede observarse, se requieren al menos 57 muestras negativas para que el límite superior del intervalo de confianza sea inferior o igual a 0.05, es decir, para que el histórico de datos sea suficiente, por sí mismo, para establecer la vida útil del producto. Ante la obtención del algún resultado positivo será necesario aumentar el número de muestras analizadas para que el límite superior del intervalo de confianza permanezca inferior o igual 0.05.

Tabla 6. Ejemplo de cálculo del límite superior del intervalo de confianza mediante la herramienta de la red BIOQURA con un nivel de confianza del 95%.

Nº muestras analizadas	Nº muestras positivas ⁽¹⁾	Proporción estimada de muestras positivas ⁽¹⁾ por cada 1000 muestras	Límite superior del Intervalo de Confianza
20	0	132.9	0.133
40		70.5	0.07
57		50.3	0.05
100		29.2	0.029
20	1	198.1	0.198
40		108.0	0.108
57		77.9	0.078
100		45.7	0.046
20	2	249.2	0.249
40		139.3	0.139
57		101.2	0.101
100		59.9	0.06

(1) Muestras positivas: con niveles superiores al límite microbiológico aplicable o, en su defecto, al nivel de contaminación aceptable para dicho peligro.

En caso de que el intervalo de confianza obtenido sea superior a 0.05, deberán emplear datos complementarios, como por ejemplo, relativos al muestreo de superficies y de calidad de materias primas. La autoridad competente podrá requerir complementar los datos con estudios adicionales para justificar la vida útil establecida.



Listeria monocytogenes

En el caso de **alimentos listos para el consumo en los que *L. monocytogenes* puede crecer o se desconoce este dato**, el histórico de datos de los niveles al inicio y final de la vida útil puede utilizarse para validar y verificar la vida útil.

Cuando el histórico de datos muestre que al final de la vida útil el nivel de *L. monocytogenes* es **consistentemente bajo o ausente**, y no se han obtenidos resultados superiores a 100 ufc/g, estos datos pueden usarse en combinación con datos de muestreo de superficies y de calidad de materias primas proporcionando un nivel suficiente de confianza de que *L. monocytogenes* no superará los 100 ufc/g durante su vida útil.

Para incluir como criterio de validación de la vida útil los resultados de análisis de superficies, las superficies muestreadas deberán seleccionarse utilizando los criterios del análisis del riesgo. Para aumentar la probabilidad de detección, las muestras deberán tomarse durante el proceso de producción después de dos horas mínimo de procesado o al final del mismo. Para más información sobre el muestreo de superficies se puede consultar el documento "Directrices para el muestreo oficial de líneas de producción de alimentos listos para el consumo que pueden plantear riesgo de *Listeria monocytogenes* y actuaciones consiguientes" publicado por la AESAN y disponible en el siguiente enlace:

http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/interpretaciones/biologicas/listeria_anexo.pdf

Otro documento de referencia en el muestreo de superficies para *L. monocytogenes* es "Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes*", elaborado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la *Listeria monocytogenes* en colaboración con otras instituciones. Esta guía está disponible en el siguiente enlace:

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidelines_on_sampling.pdf

8.4.4. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS.

A) ANÁLISIS SENSORIAL.

El deterioro de las características sensoriales es la causa que determina la vida útil en la mayor parte de los alimentos. La estimación sensorial de la vida útil de un alimento consiste básicamente en la evaluación de las características sensoriales de un conjunto de muestras en diferentes tiempos de almacenamiento.

La complejidad de los estudios de evaluación sensorial puede ser alta y en la literatura encontramos diferentes modalidades. Normalmente a mayor número de personas interviniendo en la evaluación sensorial y posterior análisis estadístico de los resultados mayor fiabilidad tendrán los resultados. Sin embargo, en pequeñas industrias los estudios de evaluación sensorial pueden consistir en pruebas sencillas con un número reducido de personas interviniendo en la evaluación. Posteriormente, el histórico de ausencia de reclamaciones de clientes y consumidores apoyará las fechas establecidas o puede ser necesario estudios adicionales.

La evaluación se puede realizar con catadores entrenados pero los resultados, cuando se utilizan consumidores finales, pueden ser más acertados. La percepción de los consumidores puede variar según las costumbres y origen de aquellos.

32

En el caso del pescado fresco, la FAO (1999) establece una clasificación de frescura en función de diversas características organolépticas, entre las que destacan olor, color y textura. Para más información sobre los atributos a considerar en esta clasificación puede consultar el siguiente enlace: <http://www.fao.org/docrep/V7180S/V7180S00.HTM>

Finalmente, el estudio del deterioro de las características sensoriales también puede llevarse a cabo mediante la determinación de diferentes parámetros o índices. Por ejemplo, en alimentos grasos, la determinación de peróxidos puede emplearse como indicador del grado de rancidez. Así, la medición de estos parámetros permite detectar y cuantificar, de forma objetiva, los cambios organolépticos o sensoriales que puedan limitar la vida útil de los alimentos.

B) MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA/MODELOS MATEMÁTICOS

La microbiología predictiva tiene como objeto predecir el comportamiento de los microorganismos en función de los factores que afectan a su crecimiento, producción de toxina, supervivencia, etc.

Es una herramienta útil para proporcionar una base científica en la toma de decisiones durante la determinación de la vida útil y en el marco de los procedimientos de autocontrol basados en los principios del APPCC. Existen diversos modelos que predicen el crecimiento microbiano bajo diferentes condiciones de temperatura, pH, a_w , atmósfera de envasado, etc. En general, estos modelos se han desarrollado

en condiciones laborales, sobre medios de cultivo, aunque algunos de ellos se han validado en alimentos concretos, siendo estos últimos más precisos en la predicción del comportamiento del microorganismo.

La microbiología predictiva es una herramienta que puede aportar mucha información pero debe ser usada con precaución y solo por personal con conocimientos y experiencia suficiente. En cualquier caso, siempre debe considerarse el peor escenario posible. Algunos modelos de microbiología predictiva están disponibles de forma gratuita en internet. Los principales modelos son:

- ComBase Predictor Model (www.combase.cc)
- DMRI predict (www.dmripredict.dk)
- Food Spoilage SP (www.fssp.food.dtu.dk)
- Pathogen Modelling Programme (www.pmp.errc.ars.usda.gov)
- Corbion listeria Control Model (www.clcm.corbion.com)

Esta herramienta no está indicada en los casos en los que se desconozca el nivel inicial de contaminación de la que parte el producto.

C) ANÁLISIS LABORATORIALES:

i) ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE ALTERACIÓN.

Los microorganismos indicadores de alteración son microorganismos cuya presencia en los alimentos a cierto nivel puede utilizarse para predecir la vida útil del producto. Pueden ser microorganismos alterantes cuyo crecimiento va ligado, paralelamente, a una pérdida de calidad del producto, por lo que su investigación y recuento puede ser de utilidad para estimar o establecer la durabilidad de un alimento cuando ésta esté limitada por motivos de deterioro organoléptico.

En general, estos microorganismos cumplen los siguientes requisitos:

- Están presentes en algunos alimentos.
- Se detectan y enumeran fácilmente, en corto periodo de tiempo, pudiendo distinguirlos claramente de otros microorganismos.
- Su crecimiento y número se correlaciona directamente y de forma negativa sobre la calidad del alimento.

La tabla 7 muestra algunos de los principales signos de alteración observados en carnes, pescados y derivados, los principales microorganismos implicados y la correlación entre dicha alteración con los recuentos de microorganismos totales observados en diversos estudios. Tal y como puede observarse en la tabla 7, en algunos casos un mismo microorganismo indicador puede indicar la alteración de diversos alimentos mientras que, en otros, el microorganismo indicador de alteración es específico de un alimento concreto. De forma general, los microorganismos indicadores de alteración específicos de un alimento suelen ser más fiables para determinar la vida útil.

Tabla 7. Ejemplos de signos de alteración y algunos microorganismos responsables en carnes, pescados y derivados.

Alimento	Signos de alteración	Microorganismo implicado	Recuentos totales
Salchichas cocidas, beicon, salami y productos similares	Limo superficial	Levaduras y Bacterias ácido lácticas de los géneros <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i> y <i>Brochothrix thermosphacta</i> .	---
	Acidificación	Lactobacilos, enterococos	---
	Enverdecimiento	<i>Weissella viridescens</i> entre otros, como <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus fructivorans</i> y <i>Lactobacillus jensenii</i> .	---
Carne fresca de ave	Olor fuerte y repugnante	<i>Pseudomonas</i>	$7.2 - 8 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ aerobios totales
	Limo superficial y olor a víscera	Levaduras y enterococos	$\geq 8 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ aerobios totales
Carne roja fresca	Olor desagradable	<i>Pseudomonas</i> , <i>Moraxella</i> y <i>Acinetobacter</i> .	$7 - 7.5 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ aerobios totales
	Limo superficial		$7.5 - 8 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ aerobios totales
	Hueso hediondo	<i>Clostridium</i> y <i>Enterococcus</i> .	---
Hígados frescos	Limosidad y olor desagradable	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Escherichia</i> , estreptococos lácticos y <i>Brochothrix thermosphacta</i> .	---
Carne picada de vacuno	Mal olor, pegajosidad	<i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> y <i>Aeromonas</i> .	

Alimento	Signos de alteración	Microorganismo implicado	Recuentos totales
Pescado fresco	Olores extraños, limo superficial, pérdida firmeza	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> .	10^8 ufc/g aerobios totales
Pescado marinado (con sal y azúcar)	Producción tiramina	<i>Carnobacterium piscicola</i> , <i>Weissella viridescens</i>	$10^7 - 10^{10}$ ufc/g bacterias lácticas totales
Pescado ahumado envasado al vacío o en AMP	Cambios de coloración	Enterobacterias psicotrofas (<i>Pantoea agglomerans</i> y <i>Serratia liquefaciens</i>)	$10^3 - 1.2 \times 10^7$ ufc/g enterobacterias totales
Moluscos frescos	Olores extraños, limo superficial, pérdida firmeza	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i>	---
Crustáceos frescos	Olor amoniacal	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> y levaduras	---

Fuente: Davidson y col., 1973; Jay y col., 2005. Lerke y col., 1965.

ii) ESTUDIOS DE DURABILIDAD.

Son pruebas que permiten evaluar el crecimiento de un microorganismo, o formación de sus toxinas o metabolitos, en un alimento contaminado de manera natural, no existiendo inoculación inicial del microorganismo a estudiar.

El alimento se somete a condiciones de tiempo y temperatura razonablemente previsible, de transporte, distribución y empleo final del consumidor. Al final de la vida útil se verifica que los microorganismos de interés, sus toxinas o metabolitos, no sobrepasan los límites de aceptabilidad establecidos.

Durante el muestreo debe tenerse en cuenta la heterogeneidad y el tamaño del lote, por ello, es conveniente realizar un muestreo aleatorio simple, en el que todas las unidades de la muestra han tenido la misma probabilidad de ser incluidos en ella. A mayor tamaño y heterogeneidad del lote mayor tamaño de muestra debe analizarse para que sea representativa.

Para valorar los resultados obtenidos en el estudio de durabilidad se recomienda calcular el intervalo de confianza asociado a la proporción estimada de unidades

que superarán el límite de máximo establecido (en el caso de *L. monocytogenes*, 100 ufc/g). Para ello se pueden utilizar diferentes herramientas disponibles en la web, como la ya mencionada desarrollada por la red BIOQURA o la herramienta CAUSAS CIENTIA, disponible en el siguiente enlace: https://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html.

No obstante, si los estudios de durabilidad van acompañados de otros métodos complementarios como por ejemplo, microbiología predictiva, histórico de datos o literatura científica podría reducirse el número de muestras a analizar. Tras almacenar la muestra en las condiciones razonablemente previsibles de almacenamiento y distribución, debe realizarse un recuento del microorganismo, toxina o metabolito de interés en el caso objeto de estudio.

La tabla 8 describe los métodos analíticos de referencia para los principales peligros que pueden limitar la vida útil de los alimentos refrigerados y sus límites legales o de aceptabilidad.

Tabla 8. Métodos analíticos de referencia para el recuento de los principales peligros limitantes de la vida útil de los productos refrigerados y sus límites legales o de aceptabilidad.

Peligro	Método analítico	Límites legales / aceptabilidad		
<i>Listeria monocytogenes</i>	EN ISO 11290-2	100 ufc/g		
<i>Clostridium botulinum</i>	ELISA; Bioensayo en ratón; Espectrometría de masas	Ausencia de toxina botulínica (dosis tóxica: 70 µg v.o.)		
Histamina	HPLC	100 mg/kg ⁽¹⁾	200 mg/kg ⁽²⁾	400 mg/kg ⁽³⁾

(1) Límite aplicable a productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido en histidina.

(2) Límite aplicable a productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido en histidina que hayan sido sometidos a tratamiento de maduración enzimática (distintos de las salsas de pescado producidas por fermentación).

(3) Límite aplicable a salsa de pescado producida por fermentación de productos de la pesca. Fuente: ANSES, 2010; EFSA; 2005; Eklund y col., 1967; Reglamento (CE) No 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

En caso de no utilizar los métodos analíticos de referencia deberán emplearse métodos validados respecto a los de referencia conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140-2 y estén validados para la categoría de alimentos especificada en el criterio microbiológico pertinente o estén validados para un conjunto amplio de alimentos en el sentido de la norma EN/ISO 16140-2. Los métodos registrados podrán ser utilizados como métodos alternativos a condición de que estén validados respecto a los de referencia conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140-2 y estén certificados por un organismo de certificación independiente.



Listeria monocytogenes

Para más información específica sobre los **estudios de durabilidad** para *L. monocytogenes* se debe consultar las siguiente guías:

- 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:

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance_document_lysteria.pdf

- EURL Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, disponible en:

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_tech-guide-doc_lysteria-in-rte-foods_en.pdf

En estos documentos se establece que los estudios de durabilidad son más realistas que los ensayos de desafío. Sin embargo, la probable baja prevalencia en el alimento de unidades contaminadas y la distribución heterogénea de *L. monocytogenes* puede hacer difícil de interpretar los resultados de manera que pueden ser necesarias otras herramientas como los ensayos de desafío para justificar la vida útil.

Un histórico de estudios de durabilidad puede usarse para evaluar la proporción (asociada a un intervalo de confianza) de unidades que superaran el límite de 100 ufc/g después de un periodo de almacenamiento que considere las condiciones probables de almacenamiento.

La autoridad competente podrá requerir complementar los datos con estudios adicionales para justificar que no superará los 100 ufc/g durante su vida útil.

El anexo IV describe la información mínima que deben contener los estudios de durabilidad en relación con *L. monocytogenes*.

iii) ENSAYOS DE DESAFÍO (CHALLENGE TEST)

Son estudios de laboratorio que miden el crecimiento de microorganismos o formación de toxinas o metabolitos, de especial interés, inoculados en el producto en cuestión.

Los ensayos de desafío sirven para evaluar el potencial crecimiento de un microorganismo, es decir si puede o no crecer en un alimento específico, o estimar parámetros como la velocidad máxima de crecimiento.



Listeria monocytogenes

Para más información específica sobre **ensayos de desafío** consultar las guías mencionadas en el apartado anterior.

El informe del Comité Científico de la AESAN en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios (http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/LISTERIA_M.VIDA_UTIL.pdf) indica que "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." Así, por ejemplo, son útiles en alimentos listos para el consumo de baja prevalencia de *L. monocytogenes* o en los que se desconozca la contaminación inicial de partida.

Este tipo de ensayo debe tener en cuenta la variabilidad de los alimentos, tanto en lo relativo a los características extrínsecas e intrínsecas como en la contaminación inicial existente.

Hay dos tipos de ensayos de desafío.

- Ensayos de evaluación del potencial de crecimiento
- Ensayos de evaluación de la velocidad máxima de crecimiento

En caso de que el alimento permita el crecimiento, ambos estudios permiten estimar la concentración de *L. monocytogenes* al final de la vida útil a partir de la concentración inicial de manera que se justifique que no excederá las 100 ufc/g al final de la vida útil.

iv) INDICADORES FÍSICO-QUÍMICOS DE DETERIORO EN PRODUCTOS DE LA PESCA FRESCOS

Debido a sus características intrínsecas, los productos de la pesca frescos son alimentos que suelen experimentar reacciones de deterioro en un corto periodo de tiempo desde su captura. Para determinar su frescura, pueden emplearse diferentes métodos, como por ejemplo los análisis sensoriales (véase apartado 8.4.4. Estudios complementarios; A) Análisis sensorial). Sin embargo, se han descrito diversos indicadores físico-químicos de deterioro que permiten evaluar la frescura del pescado. La tabla 9 describe los principales indicadores físico-químicos de deterioro disponibles en pescado.

Tabla 9. Principales indicadores físico-químicos de deterioro en pescado fresco.

Indicador	Cálculo	Fundamento	Valores aceptables	Fuente
NBVT	NBVT = aminas + bases volátiles	Incluye la medición de compuestos volátiles que se producen como consecuencia de procesos de deterioro de productos pesqueros.	Valores máximos: <i>Sebastes spp.</i> , <i>Helicolenus dactylopterus</i> , <i>Sebastichthys capensis</i> : 25 mg N / 100 g carne <i>Pleuronectidae</i> (salvo fletán): 30 mg N / 100 g carne <i>Salmo salar</i> , <i>Merlucciidae</i> , <i>Gadidae</i> : 35 mg N / 100 g carne	Reglamento (CE) N° 2074/2005
Índices de TMA	Índice de TMA = $\log(1 + \text{valor de TMA})$	Es una amina volátil asociada con el olor típico del pescado en deterioro. Se forma por la reducción del OTMA.	Niveles de frescura: 10 – 15 mg N-TMA / 100 g de pescado. Niveles alteración: 15 – 50 mg N-TMA / 100 g de pescado.	FAO, 1999 Casajuaña, 1987 Del Valle y col., 2006
Compuestos de degradación del ATP	Valor K (%) = $\frac{[\text{Ino}] + [\text{Hx}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + [\text{Ino}] + [\text{Hx}]} \times 100$	Incluye la medición de indicadores de la degradación nucleotídica.	Valor K bajo indica mayor frescura. K < 20% adecuada frescura.	FAO, 1999 Gallardo, 1978

Indicador	Cálculo	Fundamento	Valores aceptables	Fuente
	[Hipoxantina]		Valores de alrededor 3.5 μ M de Hx / g indican buen estado de frescura.	
Aminas	Índice de calidad = ppm histamina + ppm putrescina + ppm cadaverina / ppm espermidina + ppm espermina x 100	Las aminas se producen como consecuencia de la descarboxilación de algunos aminoácidos. Las bacterias que se desarrollan en el producto liberan un enzima que es capaz de realizar esa decarboxilación.	Valores inaceptables: índice calidad > 170	FAO, 1999 Vallé y col., 1996
	Índice de calidad = ppm histamina + ppm tiramina + ppm cadaverina + ppm putrescina			Visciano y col., 2012
	Contenido de aminas biógenas = ppm histamina + ppm putrescina + ppm cadaverina / ppm espermidina + ppm espermina + ppm histamina + ppm putrescina + ppm cadaverina + ppm tirosina + ppm triptamina + ppm metionina x 100		Valores inaceptables: índice aminas biógenas > 50	Vallé y col., 1996
pH	N/A	La acción de enzimas tisulares y bacterianos produce que se formen compuestos que aumentan el pH del músculo.	En general (salvo Elasmobranchios): pH 6,8 límite aceptabilidad pH > 7 – 7,5 indican alteración.	FAO, 1988

**ANEXO I:
MARCADO DE FECHAS DE CADUCIDAD
Y CONSUMO PREFERENTE**



Según el anexo X del Reglamento (UE) N° 1169/2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, la fecha de duración mínima se indicará del siguiente modo

- La fecha debe ir precedida por las palabras:
 - ▶ **“consumir preferentemente antes del...”** Cuando la fecha incluya la indicación del día.
 - Ejemplo: consumir preferentemente antes del 12 de diciembre.
 - ▶ **“consumir preferentemente antes del fin de.....”,** en el resto de los casos
 - Ejemplo: consumir preferentemente antes de diciembre 2020.
 - Ejemplo: consumir preferentemente antes de 2020.

Estas indicaciones pueden ir acompañadas de la propia fecha o de una referencia al lugar donde se indica la fecha en la etiqueta.

Si es preciso, estas indicaciones se complementarán con la referencia a condiciones de conservación que deben observarse para asegurar la duración indicada.

La fecha consistirá en la indicación clara según este orden: día, mes y, eventualmente, año. No obstante:

Los alimentos cuya **duración sea inferior a tres meses**, bastará con indicar el **día y el mes**.

Los alimentos cuya **duración sea superior a tres meses e inferior a dieciocho meses**, bastará con indicar **el mes y año**.

Los alimentos cuya **duración sea superior a dieciocho meses**, bastará con indicar **el año**.

No se requiere indicar la fecha de duración mínima en el caso de:

- Frutas y hortalizas frescas, incluidas las patatas, que no hayan sido peladas, cortadas o sometidas a cualquier otro tratamiento similar; esta excepción no se aplicará a las semillas germinantes y a productos similares, como los brotes de leguminosas,
- Vinos, vinos de licor, vinos espumosos, vinos aromatizados y productos similares obtenidos a partir de frutas distintas de la uva, así como las bebidas del código NC 2206 00 obtenidas a partir de uvas o mostos de uva,
- Bebidas con una graduación de un 10 % o más en volumen de alcohol,
- Productos de panadería o repostería que, por su naturaleza, se consumen normalmente en el plazo de veinticuatro horas después de su fabricación,
- Vinagres,
- Sal de cocina,

- Azúcares en estado sólido,
- Productos de confitería consistentes casi exclusivamente en azúcares aromatizados o coloreados,
- Gomas de mascar y productos similares de mascar.

En el caso de alimentos microbiológicamente muy perecederos y que, por ello, puedan suponer un peligro inmediato para la salud humana después de un corto periodo de tiempo, la fecha de duración mínima se cambiará por la fecha de caducidad.

La **fecha de caducidad** se indicará del siguiente modo:

- Irá precedida de la indicación “**fecha de caducidad**” acompañada de la propia fecha o una referencia del lugar donde se indica la fecha en la etiqueta.
- Estas menciones se completarán con una descripción de las condiciones de conservación que habrán de respetarse.
- La fecha consistirá en la indicación clara según este orden: día mes y eventualmente año.
- La fecha de caducidad se indicará en cada porción individual envasada.

Tabla 10. Ejemplos de posibles marcados de fecha en diferentes grupos de alimentos.

Marcado con Fecha de Caducidad	Marcado con Fecha de consumo preferente
Carnes y derivados frescos	Yogures
Pescados y derivados frescos	Quesos curados
Leche y productos lácteos frescos	Productos cárnicos curados
Comidas preparadas	Productos de la pesca seco salados
Productos cárnicos cocidos loncheados	Productos de panadería
Pescados ahumados	Galletas y similares
Frutas y hortalizas troceadas y listas para el consumo	Aceites
Ovoproductos	Frutos secos
Quesos de pasta blanda y semiblanda	Bebidas alcohólicas
Zumos de fruta no sometidos a tratamiento de pasterización o similar.	Alimentos sometidos a tratamientos de esterilización sin posibilidad de recontaminación.

**ANEXO II:
CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES
PELIGROS ASOCIADOS A LA VIDA ÚTIL
Y MEDIDAS DE CONTROL.**



Tabla 11. Características de crecimiento e inactivación de *Listeria monocytogenes*.

Peligro	Características				Alimentos asociados	
	Crecimiento de células vegetativas			Puede sobrevivir pero no crecer		
	Mín.	Ópt.	Máx.			
<i>Listeria monocytogenes</i>	Temperatura (°C)	-2	30 - 37	45	-18	<p><u>Alimentos listos para el consumo.</u></p> <p>Principales alimentos implicados: queso blanco madurado (tipo Brie y Camembert) de leche cruda; salmón ahumado y trucha ahumada;</p> <p>Productos cárnicos cocidos y loncheados; Patés; Queso de pasta blanda madurado de leche pasteurizada; Salami; Ensaladas preparadas listas para tomar; Salsas; Sándwiches; Pescado cocido; Platos preparados precocinados; Quesos de pasta dura de leche pasteurizada.</p>
	pH	4.2 - 4.3	≈7	9.6	3.3 - 4.2	
	a_w	0.92	0.99	-	<0.90	
	Concentración de sal	< 0.5	0.7	12 - 16	≥ 20	
	Medidas de control y recomendaciones					
	<ul style="list-style-type: none"> □ Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo envasado al vacío o atmósferas modificadas. □ El tiempo de reducción decimal (D) para 65 °C es de 0.2 - 2 minutos. □ Se destruye rápidamente con pH superiores a 10. 					

Fuente:: ANSES, 2011; Low y Donachie, 1997.

Tabla 12. Características de formación, medidas de control y recomendaciones del peligro histamina.

Peligro	Características	Alimentos asociados
<p>Histamina</p>	<p>Formación</p> <ul style="list-style-type: none"> □ Existen muchas bacterias con actividad descarboxilasa, es decir, capaces de formar histamina. □ Algunas de las bacterias productoras de histamina más relevantes para la vida útil son <i>Morganella psychotolerans</i> o <i>Photobacterium phosphoreum</i>, bacterias psicótropas que pueden producir histamina entre 0 – 5 °C. 	<p><u>Productos de la pesca asociados con un alto contenido en histidina</u> (familias: Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae y Scombrososidae).</p>
	<p>Medidas de control y recomendaciones</p> <ul style="list-style-type: none"> □ La histamina es termorresistente, puede persistir en conservas y otros alimentos sometidos a tratamiento térmico. □ Una de las medidas más eficaces está basada en las buenas prácticas higiénicas, como evisceración y refrigeración rápida (< 2 °C). 	

Tabla 13. Características de crecimiento, producción de toxinas e inactivación de *Clostridium botulinum*.

Peligro	Características				Alimentos asociados
<p><i>Clostridium botulinum</i> no proteolítico (Grupo II)</p>	Crecimiento de células vegetativas				
		Mín.	Ópt.	Máx.	
	Temperatura (°C)	3	18 - 25	45	<p>Alimentos envasados al vacío o en atmósferas protectoras poco ácidos:</p> <p>Toxina tipo B: mortadelas, jamón crudo seco y salado, productos de charcutería (patés)</p> <p>Toxina tipo E: pescado salado y seco, marinados de pescado o carne de foca fermentada, envasados al vacío.</p>
	pH	5	7	9	
	a_w	0.97	-	-	
	% NaCl inhibitorio	5			
	Producción de toxinas				
	Temperatura mínima	3.3 °C			
	a_w mínima	0,97			
	Estabilidad e inactivación de toxinas	Las toxinas son resistentes a la congelación. Se destruye después de 100°C durante 10 minutos o 80 °C durante 30 minutos (o tratamientos equivalentes).			
Medidas de control y recomendaciones					
<p><input type="checkbox"/> Las esporas de <i>C. botulinum</i> B y E son inactivas a concentraciones de 4.5 ppm de cloro libre (pH 6.5).</p> <p><input type="checkbox"/> Las esporas son resistentes a la congelación.</p>					

Peligro	Características	Alimentos asociados		
	<ul style="list-style-type: none"> □ Las esporas pueden ser inactivadas por una combinación de tratamiento térmico y altas presiones. □ El tiempo de reducción decimal para las esporas (D) para 80 °C es de 0.6 – 1.25 minutos (variable según cepas). □ Las esporas se inactivan con tratamientos de 90 °C durante 10 minutos o tratamientos de efecto equivalente. □ Concentraciones de sal del 10% combinados con concentraciones de 150 ppm de nitritos son eficaces para inhibir el crecimiento de <i>C. botulinum</i>. 			
<p style="text-align: center;"><i>Clostridium botulinum</i> proteolítico (Grupo I)</p>	Crecimiento de células vegetativas			
		Mín.	Ópt.	Máx.
	Temperatura (°C)	10	35 - 40	48
	pH	4.6	9.0	9
	a_w	0.94		
	% NaCl inhibitorio	10		
	Producción de toxinas			
Temperatura mínima	10°C			
a_w mínima	0.94			
<p>Alimentos envasados al vacío o en atmósferas protectoras poco ácidas:</p> <p>Toxina tipo A: conservas vegetales, salazones a base de carne de vaca, embutidos caseros.</p>				

Peligro	Características		Alimentos asociados
	Estabilidad e inactivación de toxinas	Las toxinas son resistentes a la congelación. Se destruye después de 100°C durante 10 minutos o 80 °C durante 30 minutos (o tratamientos equivalentes).	
	<p align="center">Medidas de control y recomendaciones</p> <ul style="list-style-type: none"> ❑ Las esporas de <i>C. botulinum</i> A son inactivas a concentraciones de 4.5 ppm de cloro libre (pH 6.5). ❑ Las esporas son resistentes a la congelación. ❑ Las esporas pueden ser inactivadas por una combinación de tratamiento térmico y altas presiones. ❑ El tiempo de reducción decimal para las esporas (D) para 121.1°C es de 0.021 minutos. ❑ Concentraciones de sal del 10% combinados con concentraciones de 150 ppm de nitritos son eficaces para inhibir el crecimiento de <i>C. botulinum</i>. ❑ Las esporas se inactivan con tratamientos de 121 °C durante 3 minutos. 		

Fuente: ANSES, 2010

Tabla 14. . Características de crecimiento, producción de toxinas e inactivación de Yersinia enterocolítica

Peligro	Características				Alimentos asociados
	Crecimiento de células vegetativas				
		Min.	Ópt.	Máx.	
	Temperatura (°C)	0	29	45	
	pH	4.2	7.2 – 7.4	10	
	a _w	0.96	1	1	
	% NaCl inhibitorio	5			
	Producción de toxinas				
	Temperatura mínima	6	25	37	
	pH	7 - 8			
	Medidas de control y recomendaciones				
	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> La pasteurización es un tratamiento térmico eficaz contra <i>Yersinia</i>. <input type="checkbox"/> El tiempo de reducción decimal es de 2 – 7.7 minutos a 55 °C, 1.2 – 1.6 minutos a 60 °C y 2 – 10 segundos a 65 °C. <input type="checkbox"/> La toxina se mantiene estable después de la congelación y después de un calentamiento de 121 °C durante 15 minutos. <input type="checkbox"/> Medidas de control: buenas prácticas de higiene y manipulación durante el faenado de canales. 				
Yersinia enterocolítica	<p><u>Carnes de cerdo</u> (lengua, carne picada).</p> <p>En menor medida leche cruda de vacuno, vegetales, tofu. Los productos lácteos, el tofu y vegetales han sido el origen de las epidemias.</p>				

Fuente: ANSES, 2012

Tabla 15. Características de crecimiento, producción de toxinas e inactivación de *Bacillus cereus*.

Peligro	Características				Alimentos asociados	
<i>Bacillus cereus</i>	Crecimiento de células vegetativas					
		Mín.	Ópt.	Máx.		
	Temperatura (°C)	4 – 10	30 – 37	55		
	pH	4.3	6 – 7	9.3		
	a _w	0.92	0.99 – 1	-		
	NaCl inhibitorio (g/L)	50				
	Producción de toxinas					
	Temperatura mínima	10	20 – 25	40		
	pH	2-9 (toxina emética)				
	NaCl (g/L)	50				
Medidas de control y recomendaciones						
<ul style="list-style-type: none"> □ Con concentraciones de CO₂ por encima de 40 – 50% se puede inhibir su crecimiento. □ El cocinado de alimentos no permite garantizar la ausencia de esporas. □ El tiempo de reducción decimal es de 2 minutos a 95 °C, 1.2 – 7.5 minutos a 100 °C y 3.4 minutos a 120 °C. □ Tratamientos térmicos de 70 °C durante 12 segundos o 105 °C durante 36 segundos permiten obtener 6 reducciones logarítmicas. □ Las toxinas diarreicas se destruyen con tratamientos a 56 °C durante 5 minutos. La toxina emética se destruye con tratamientos de 126 °C durante 90 minutos. 					<p><u>Productos a base de arroz.</u></p> <p>Carnes de cerdo (lengua, carne picada).</p> <p>En menor medida leche cruda de vacuno, vegetales, tofu. Los productos lácteos, el tofu y vegetales han sido el origen de brotes alimentarios.</p>	

Fuente: ANSES, 2011

**ANEXO III:
CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS RELEVANTES
PARA LA VIDA ÚTIL DE LOS PRODUCTOS
ALIMENTICIOS**



El REGLAMENTO (CE) N° 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas de aplicación que deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene generales y específicas contempladas en el artículo 4 del Reglamento (CE) N° 852/2004.

El reglamento define:

1.- «criterio microbiológico»: criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote;

2.- «criterio de seguridad alimentaria»: criterio que define la aceptabilidad de un producto o un lote de productos alimenticios y es aplicable a los productos comercializados;

En el mismo se establece que, cuando sea necesario, los explotadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria.

1. Criterio de seguridad para *Listeria monocytogenes* aplicable a los alimentos listos para su consumo (LPC).

Se definen «alimentos listos para el consumo» como los alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos.

En el capítulo I del anexo I, se establecen los siguientes criterios de seguridad:

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo		límites		Método analítico de referencia (8)	Fase de la cadena en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.1. Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales (4)	Listeria monocitogenes	10	0	No detectado en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil.
		5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2(6)	Productos comercializados durante su vida útil.
1.2. Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de L. monocitogenes que no sean los destinados a lactantes ni para usos médicos especiales.	Listeria monocitogenes	5	0	No detectado en 25 g(7)		EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido.
1.3. Alimentos listos para el consumo que NO pueden favorecer el desarrollo de L. monocitogenes, que no sean los destinados a lactantes ni para usos médicos especiales(4), (8)	Listeria monocitogenes	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2(6)	Productos comercializados durante su vida útil.

(4) En circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a este criterio para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo:

- Los que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar L. monocitogenes, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final).
- Frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas.
- Pan, galletas y productos similares.
- Aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares.
- Azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate.
- Moluscos bivalvos vivos.
- Sal de cocina.

(5) Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. El explotador podrá fijar límites intermedios durante el proceso que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

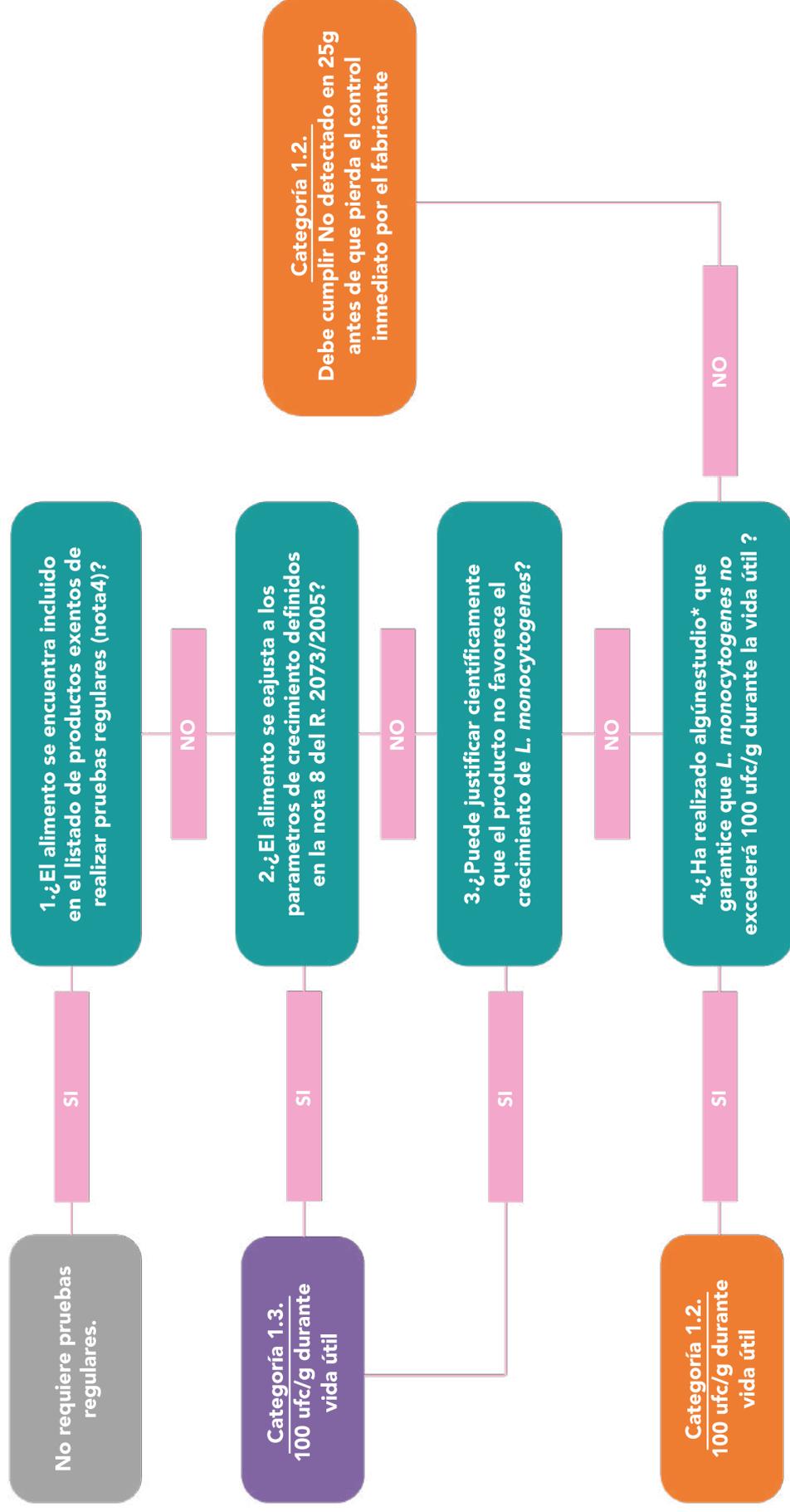
(7) Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.

(8) Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con $pH \leq 4.4$ o $aw \leq 0.92$, productos con $pH \leq 5.0$ y $aw \leq 0.94$, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

Los alimentos LPC de la categoría 1.3 que no favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* (y los alimentos LPC de la categoría 1.1 destinados a lactantes y a usos médicos especiales) que se encuentren incluidos en la nota 4, están exentos de realizar controles regulares de este patógeno en el producto final, pero sí están obligados a dar garantía del cumplimiento del criterio microbiológico que les aplica respectivamente, por lo que debe quedar debidamente justificado en su sistema APPCC que en el procesado han recibido un tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes* y que no es posible la recontaminación tras el tratamiento (por ejemplo productos tratados térmicamente en su envase final).

En el caso de los alimentos listos para el consumo pertenecientes a la categoría 1.3, es decir, que no favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*, se deberán llevar a cabo los estudios necesarios para justificar que, efectivamente, no permiten el crecimiento de dicho patógeno. En algunos casos estos estudios podrán consistir en demostrar que el alimento se ajusta a las características físico-químicas definidas en la nota 8 (a_w y pH) y, en el caso en el que el producto no se ajuste a dichos parámetros, deberán realizarse estudios complementarios para justificar científicamente la ausencia de crecimiento de *L. monocytogenes*, como por ejemplo empleando literatura científica, ensayos de desafío o microbiología predictiva.

En los alimentos LPC que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, distintos de los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (categoría 1.2), los operadores alimentarios deben de realizar los estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento del límite de 100 ufc/g a lo largo de toda la vida útil. El criterio cualitativo de no detectado en 25 g es solo aplicable en los casos en los que el operador alimentario no haya efectuado los estudios que demuestren, a satisfacción de la autoridad competente, que no se superaran el límite de 100 ufc/g durante la vida útil del producto. La autoridad competente valorará los estudios teniendo en cuenta los contenidos de esta guía (véase árbol de decisiones figura 11).



Estudios*: pueden estar basados en microbiología predictiva, estudios de desafío u otros siempre que justifique, a satisfacción de la Autoridad Competente, que no superará los 100 ufc/g teniendo en cuenta las condiciones previsibles de almacenamiento y distribución.

Figura 11. Árbol de decisiones para la aplicación del criterio microbiológico de seguridad alimentaria de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo distintos de los destinados a lactantes o usos médicos especiales.

2. Criterio de seguridad aplicable ciertos productos de la pesca.

El capítulo I del anexo I, establece los siguientes criterios de seguridad alimentaria:

Categoría de alimento	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo		límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.26. Productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido en histidina (17)	Histamina	9	2	100 mg/kg	200 mg/Kg	HPLC	Productos comercializados durante la vida útil.
1.27. Productos de la pesca, excepto los de la categoría de alimentos 1.27a, sometidos a tratamiento de maduración enzimática en salmuera, fabricados a partir de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina (17)	Histamina	9	2	200 mg/Kg	400 mg/Kg	HPLC	Productos comercializados durante la vida útil.
1.27a. Salsa de pescado producida por fermentación de productos de la pesca.	Histamina	1	0	400 mg/Kg		HPLC	Productos comercializados durante la vida útil.

Nota 17: Particularmente especies de pescados de las familias siguientes: Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae y Scomberesocidae.

**ANEXO IV:
INFORMES DE LABORATORIO PARA LOS
ESTUDIOS DE DURABILIDAD Y DE DESAFÍO EN
RELACIÓN A LISTERIA MONOCYTOGENES.**



Tabla 16. Información mínima que debe incluir un informe de estudio de vida útil realizado mediante ensayo de desafío para *L. monocytogenes* para estimar el potencial de crecimiento.

ENSAYO DE DESAFÍO PARA POTENCIAL DE CRECIMIENTO	
Número de informe	
Objetivo del estudio	
Tipo de test de desafío: de potencial de crecimiento	
Descripción completa del alimento:	
<input type="checkbox"/> Nombre del producto	
<input type="checkbox"/> Características (pH, a_w , microbiota asociada, etc.),	
<input type="checkbox"/> Vida útil prevista	
<input type="checkbox"/> Identificación de lotes muestreados	
<input type="checkbox"/> Fechas de inicio de la vida útil	
Información relativa al test de desafío:	
<input type="checkbox"/> Número de lotes muestreados y justificación	
<input type="checkbox"/> Número de unidades muestreadas por lote y por día de análisis	
<input type="checkbox"/> Masa o volumen del alimento inoculado	
<input type="checkbox"/> Cepas inoculadas	
<input type="checkbox"/> Características de las cepas y justificación de su elección	
<input type="checkbox"/> Preparación del inóculo	
<input type="checkbox"/> Concentración del inóculo	
<input type="checkbox"/> Volumen del inóculo inoculado por unidad muestreada	
<input type="checkbox"/> Método de contaminación	
<input type="checkbox"/> Día de inoculación	
<input type="checkbox"/> Duración del test e intervalos de muestreo	
<input type="checkbox"/> Temperatura y duración de almacenamiento y justificación	
<input type="checkbox"/> Método analítico de detección y recuento utilizado	
<input type="checkbox"/> Límites de recuento	
<input type="checkbox"/> Parámetros físico-químicos del alimento al inicio y al final del estudio	
<input type="checkbox"/> Atmósfera de envasado	
<input type="checkbox"/> Concentración de microbiota asociada al inicio y al final del estudio	
<input type="checkbox"/> Concentración de <i>L. monocytogenes</i> al inicio y al final del estudio	
<input type="checkbox"/> Potencial de crecimiento calculado por lote	
<input type="checkbox"/> Conclusiones	

Para categorizar el alimento listo para el consumo se tendrá en cuenta que:

- Potencial de crecimiento (δ) $\leq 0.5 \log_{10}$ ufc/g se asume que el alimento no favorecerá el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- Potencial de crecimiento (δ) $> 0.5 \log_{10}$ ufc/g se asume que el alimento puede favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Para cuantificar el crecimiento de *L. monocytogenes* sobre el alimento se tendrá en cuenta que: Concentración final = concentración inicial + Potencial de crecimiento (δ). En la práctica, esto permite al operador económico predecir la concentración final de *L. monocytogenes* al final de la vida útil.

Tabla 17. Información mínima que debe incluir un informe de estudio de vida útil realizado mediante ensayo de desafío para *L. monocytogenes* para estimar la velocidad máxima de crecimiento.

ENSAYO DE DESAFÍO PARA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO	
Número de informe	
Objetivo del estudio	
Tipo de test de desafío: de velocidad máxima de crecimiento	
Descripción completa del alimento:	
<input type="checkbox"/> Nombre del producto	
<input type="checkbox"/> Características (pH, a_w , microbiota asociada, etc.),	
<input type="checkbox"/> Vida útil prevista	
<input type="checkbox"/> Identificación de lotes muestreados	
<input type="checkbox"/> Fechas de inicio de la vida útil.	
Información relativa al test de desafío:	
<input type="checkbox"/> Número de lotes muestreados y justificación	
<input type="checkbox"/> Número de unidades muestreadas por lote y por día de análisis	
<input type="checkbox"/> Masa o volumen del alimento inoculado	
<input type="checkbox"/> Cepas inoculadas	
<input type="checkbox"/> Características de las cepas y justificación de su elección	
<input type="checkbox"/> Preparación del inóculo	
<input type="checkbox"/> Concentración del inóculo	
<input type="checkbox"/> Volumen del inóculo inoculado por unidad muestreada	
<input type="checkbox"/> Método de contaminación	
<input type="checkbox"/> Día de inoculación	
<input type="checkbox"/> Duración del test e intervalos de muestreo	
<input type="checkbox"/> Temperatura almacenamiento	
<input type="checkbox"/> Método analítico de detección y recuento utilizado	
<input type="checkbox"/> Límites de recuento	
<input type="checkbox"/> Parámetros físico-químicos del alimento al inicio y al final del estudio	
<input type="checkbox"/> Atmósfera de envasado	
<input type="checkbox"/> Concentración de microbiota asociada al inicio y al final del estudio	
<input type="checkbox"/> Concentración de <i>L. monocytogenes</i> a lo largo del estudio del estudio	
<input type="checkbox"/> Curva de crecimiento elaborada a partir de los recuentos obtenidos	
<input type="checkbox"/> Cálculo de la velocidad de crecimiento máxima obtenida en cada lote	
<input type="checkbox"/> Conclusiones	

Tabla 18. Información mínima que debe incluir un informe de estudio de vida útil realizado mediante estudio de durabilidad para *L. monocytogenes*.

ESTUDIO DE DURABILIDAD	
Número de informe	
Descripción completa del alimento:	
<input type="checkbox"/>	Nombre del producto
<input type="checkbox"/>	Características (pH, a_w , microbiota asociada, etc.),
<input type="checkbox"/>	Vida útil prevista
<input type="checkbox"/>	Identificación de lotes muestreados y fecha de fabricación
<input type="checkbox"/>	Justificación de las condiciones de conservación (tiempo y T°)
Información relativa al estudio de durabilidad:	
<input type="checkbox"/>	Número de lotes muestreados
<input type="checkbox"/>	Número de unidades muestreadas por lote
<input type="checkbox"/>	Días de muestreo
<input type="checkbox"/>	Fecha de inicio del estudio
<input type="checkbox"/>	Temperatura y tiempo de almacenamiento
<input type="checkbox"/>	Método analítico de recuento utilizado
<input type="checkbox"/>	Límites de recuento
<input type="checkbox"/>	Proporción estimada de unidades > 100 ufc/g e intervalo de confianza asociado
<input type="checkbox"/>	Conclusiones

Fuente: Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Comunidad de Madrid. Agosto 2012.

El operador económico es el responsable de establecer la vida útil de su producto en base a los resultados obtenidos en los estudios realizados. Estos resultados solo son válidos para los productos analizados. Cualquier cambio en el producto o en el proceso invalidaría el resultado del estudio de vida útil y requeriría un nuevo estudio siempre que el operador no justifique, a satisfacción de la Autoridad Competente, que estos cambios no afectan al crecimiento de *L. monocytogenes* sobre el alimento.

Los laboratorios que participan en la realización de estos estudios deberán disponer de la competencia técnica y experiencia suficientes para llevarlos a cabo de acuerdo con las directrices establecidas en el documento *EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT for conducting shelf-life studies on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*.

**ANEXO V:
EJEMPLOS DE CASOS PRÁCTICOS PARA EL
DISEÑO DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN
DE VIDA ÚTIL.**



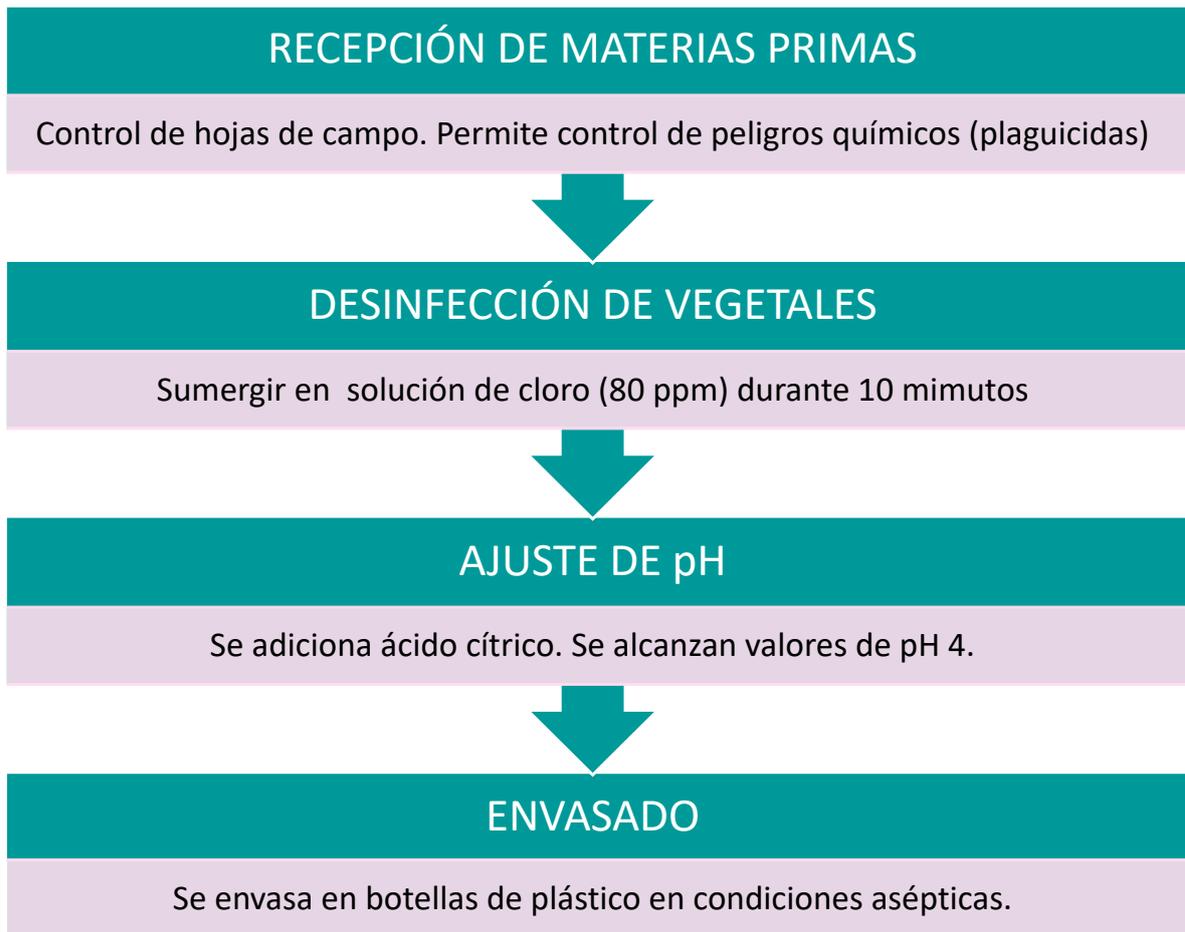
CASO PRÁCTICO: GAZPACHO

Información general del producto:

Se trata de una sopa fría lista para el consumo (gazpacho andaluz) que se distribuye refrigerado (temperatura $< 4^{\circ}\text{C}$) a establecimientos menores ubicados en un radio de 200 km (aproximadamente duración máxima de trayecto de 2 horas).

La principal medida de control microbiológico que aplica la empresa es la desinfección de vegetales y el ajuste del pH del producto.

A continuación se representa un diagrama de flujo simplificado:



ETAPA 1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y DEL PROCESO

NOMBRE DEL PRODUCTO: GAZPACHO ANDALUZ

N° Revisión: 001

Fecha última revisión: 25-06-19

- **INGREDIENTES:** agua, tomate, pan (harina de trigo, agua, sal, levadura), pimiento verde, pimiento rojo, cebolla, ajo, sal, aceite de oliva, vinagre, sal, pimienta y acidulante (E330).
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** color rojo intenso, textura líquida, ligeramente ácido. Olor y sabor propios del producto.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** pH 4, a_w 0.99.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** desinfección de vegetales con cloro (80 ppm) durante 10 minutos; acidificación del producto con ácido cítrico (E330).
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** *Escherichia coli*.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** ninguno.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** Envasado en botellas de polietileno. Se comercializa en raciones individuales (250 ml) y en formato familiar (1 litro). Cierre hermético mediante tapón de rosca. Embalado en cajas de cartón.
- **ETIQUETADO:** no realiza declaración de propiedad nutricional o saludable.
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** Proteger de la luz solar. Mantener a temperatura inferior a 4°C.
- **CONDICIONES DE USO Y MANTENIMIENTO:** Alimento listo para el consumo. Agitar y consumir. Una vez abierto consumir en 24 horas y mantener en refrigeración.
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general salvo intolerantes al gluten.

ETAPA 2: IDENTIFICACIÓN DE LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

Debido a sus características físico-químicas, entre las que destaca el pH 4, ningún microorganismo patógeno puede desarrollarse sobre el producto. Por ello, la vida útil de este alimento no está condicionada por el crecimiento de patógenos si no por la pérdida de sus atributos de calidad o por el crecimiento de microorganismos alterantes, como por ejemplo mohos y levaduras.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O FECHA DE CONSUMO PREFERENTE

Se aplica el árbol de decisiones para el marcado de fechas en los productos alimenticios (figura 7).

PASO 1: ¿Es un producto estable a temperatura ambiente? No.

PASO 2: ¿Es un producto congelado? No.

PASO 3: ¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de *L. monocytogenes*, dando lugar a un alimento nocivo? No, es un alimento listo para el consumo que no puede permitir el crecimiento de *L. monocytogenes* (pH 4).

PASO 4: ¿Puede permitir la formación de histamina o el crecimiento de *C. botulinum* no proteolítico hasta niveles inaceptables, dando lugar a un alimento nocivo? No.

PASO 5: ¿Puede deteriorarse química, física o microbiológicamente el alimento, dando lugar, a corto plazo, a un producto no apto para el consumo (deteriorado, putrefacto o descompuesto)? Sí, puede deteriorarse dando lugar a corto plazo a un producto no apto para el consumo (olores y sabores improprios del producto). Por todo ello, atendiendo a este árbol de decisiones, la vida útil de este producto deberá marcarse como fecha de caducidad.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL: HERRAMIENTAS

66

La empresa ha empleado las características físico-químicas y el histórico de datos. A continuación se muestra la información aportada:

4.1. Características físico-químicas:

Se ha realizado el siguiente muestreo para determinar el pH del producto:

Lote 1		Lote 2		Lote 3	
Nº Muestra	pH	Nº muestra	pH	Nº muestra	pH
1	4.01	1	4.05	1	3.98
2	4.1	2	4.00	2	4.01
3	4.11	3	4.00	3	4.00
4	3.99	4	4.01	4	3.99
5	3.98	5	3.99	5	3.85
6	4.00	6	3.90	6	4.15
7	3.99	7	4.00	7	4.10
8	4.02	8	4.10	8	4.50
9	4.00	9	4.00	9	3.95
10	3.97	10	3.99	10	4.55

Con estos valores se ha calculado los siguientes parámetros:

- Valor medio: 4.043
- Desviación estándar: 0.141

Se emplea la herramienta facilitada por la red Bioqura para el cálculo de la proporción estimada de unidades que podrían tener un pH > 4.4 (factor limitante del crecimiento de *L.monocytogenes*), disponible en el siguiente enlace:

<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>.

Resumen de las observaciones

pH medio:
4,043

Desv. standard del pH:
0,141

Número de medidas:
30

pH máximo admisible
4,4

Hacer cálculo



Tras introducir el valor medio obtenido (pH 4.043), desviación estándar (0.141) y el número de muestras analizadas (30 muestras) la herramienta estima que un 0,9% de unidades de cada lote podría tener un pH > 4.4 (limitante para el crecimiento de *L. monocytogenes*).

Por ello, al ser inferior al 5% la proporción de unidades que pueden tener un pH > 4.4, se considera que las características físico-químicas de este producto proporcionan evidencia suficiente de que *L. monocytogenes* no va a crecer durante la vida útil del producto.

De este modo, la vida útil de este producto no está condicionada por el crecimiento de microorganismos patógenos si no por el crecimiento de microorganismos alterantes que puedan desarrollarse a pH de 4 o inferior, como por ejemplo las levaduras, produciendo alteración de sus características organolépticas (cambios en el color, sabor, olor, etc.).

4.2. Histórico de datos

La empresa presenta un histórico de datos de los últimos 5 años en los que este producto se ha estado comercializando con una vida útil de 10 días. Así, este histórico muestra que no han habido reclamaciones o quejas de clientes relacionadas con la pérdida de los atributos de calidad del producto, presencia de olores o sabores extraños, aparición de cambios de coloración o textura, etc.

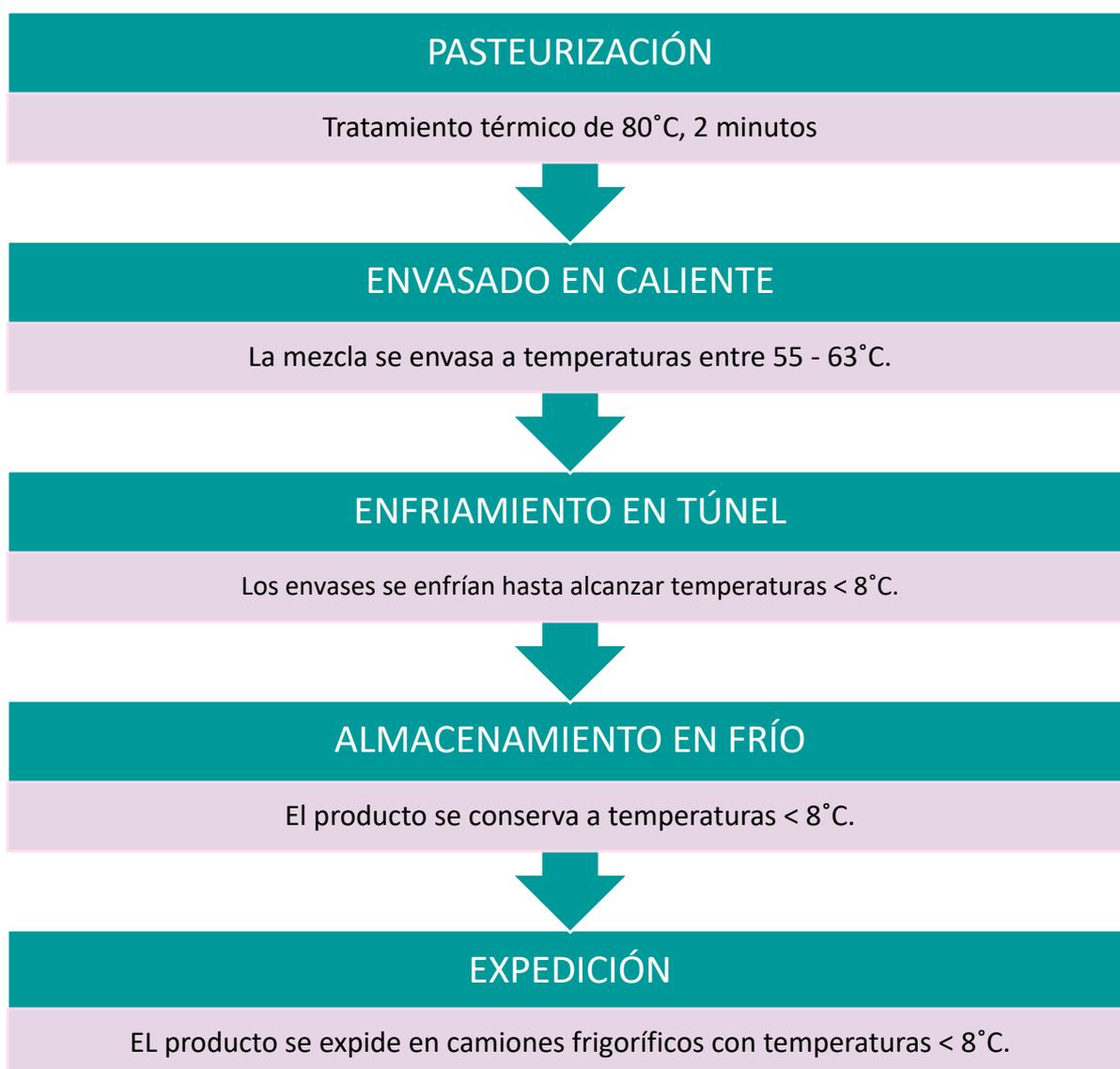
Por ello, se considera adecuada la vida útil prevista para la comercialización de este producto (10 días) y deberá marcarse sobre la etiqueta del mismo como fecha de caducidad.

CASO PRÁCTICO: GELATINA ANIMAL SIN AZÚCAR

Información general del producto:

Se trata de una gelatina animal (de origen porcino) de diferentes sabores y edulcorada, lista para el consumo. La empresa fabricante elabora una familia de productos de características de procesado y físico-químicas idénticas (gelatinas de diferentes sabores), por lo que presenta este estudio de vida útil aplicable a toda la familia de gelatinas con diferentes sabores. Las gelatinas se distribuyen a establecimientos de venta al por menor ubicados en España.

A continuación se describe un diagrama que representa el flujo de las principales etapas de elaboración que van a influir en la vida útil del producto:



ETAPA 1: DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y PROCESO

NOMBRE DEL PRODUCTO: GELATINA ANIMAL SIN AZÚCAR

N° Rev.: 001

Fecha última revisión: 31-01-20

- **INGREDIENTES:** agua, gelatina (2,2%), edulcorantes (manitol, sucralosa y acesulfame K), correctores de acidez (citrato trisódico, ácido cítrico y ácido fumárico), aroma, colorantes (antocianinas y E133) y sal.
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** color característico del sabor. Aspecto gel sin exudado. Olor característico a la fruta de sabor. Textura gelatinosa típica.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** pH 3.20 – 3.55, a_w 0.994 y °Brix 4 – 5.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** Pasteurización (PCC), envasado en caliente (RHO1), enfriamiento en túnel (RHO2), almacenamiento en frío (RHO3) y expedición (RHO4).
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** No dispone.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** *L. monocytogenes*.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** ninguno.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** Pack de 4 unidades x 100g.
- **ETIQUETADO:** según Reglamento (CE) N° 1169/2011.
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** Mantener entre 1 - 8°C.
- **CONDICIONES DE USO Y MANTENIMIENTO:** Alimento listo para el consumo. Abrir el envase y consumir.
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general.

ETAPA 2: IDENTIFICAR LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

Se trata de un alimento listo para el consumo cuyas características físico-químicas (pH 3.20 – 3.55) no pueden permitir el crecimiento de *L. monocytogenes* ni ningún otro microorganismo patógeno. Así mismo, la pasteurización seguida del envasado en caliente reduce a un nivel aceptable el riesgo de contaminación con microorganismos patógenos.

Por ello, la causa probable de pérdida de seguridad de este producto será la pérdida o alteración de las características organolépticas propias de este producto como consecuencia del desarrollo de microorganismos causantes de alteración.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O FECHA DE CONSUMO PREFERENTE

Una vez identificada la causa probable de pérdida de seguridad del producto, es necesario determinar cómo va a marcarse la vida útil: fecha de caducidad o fecha de consumo preferente.

Para ello, se podrá recurrir al árbol de decisiones establecido en la figura 7 de la guía.

PASO 1: *¿Es un producto estable a T^a ambiente? No, requiere refrigeración para su comercialización.*

PASO 2: *¿Es un producto congelado? No, el producto debe almacenarse y distribuirse entre 1 y 8°C.*

PASO 3: *¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de Listeria monocytogenes, dando lugar a un alimento nocivo? No, las características físico-químicas del producto (pH 3.20 – 3.55) no permiten su crecimiento, tal y como establece la nota 8, del Anexo I, Capítulo 1, del Reglamento (CE) No 2073/2005, de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.*

PASO 4: *¿Puede permitir la formación de histamina o el crecimiento de C. botulinum no proteolítico hasta niveles inaceptables, dando lugar a un alimento nocivo? No, la histamina no es un peligro relevante en este producto y las características físico-químicas del producto no permiten el desarrollo de C. botulinum no proteolítico.*

PASO 5: *¿Puede deteriorarse química, física o microbiológicamente el alimento, dando lugar, a corto plazo, a un producto no apto para el consumo (deteriorado, putrefacto o descompuesto)? No, el producto puede sufrir deterioro microbiológico pero éste se da a largo plazo.*

Por todo ello, procede marcar la vida útil de estos productos mediante fecha de consumo preferente.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL: HERRAMIENTAS.

La empresa realiza el estudio únicamente sobre un sabor de gelatina (sabor fresa) al considerarse que los distintos sabores no contribuyen a diferencias en la vida útil estimada.

Para establecer la vida útil la empresa decide realizar un análisis sensorial del producto y análisis de microorganismos indicadores de alteración. Para ello, las muestras se han mantenido en un frigorífico doméstico de la empresa (8°C) para reproducir las condiciones de conservación existentes en una nevera de un consumidor. Periódicamente, se han ido realizando muestreos aleatorios con el fin de evaluar las características sensoriales del producto y la evolución de los microorganismos indicadores de alteración.

También, la empresa presenta un histórico de datos obtenido durante los 2 últimos años (2018 y 2019). A continuación se muestran los resultados obtenidos:

4.1. Análisis sensorial

En la evaluación sensorial ha participado personal del departamento de calidad: personal de laboratorio, técnicos de calidad, tecnólogo de planta y personal de I+D. Se han evaluado un total de 8 muestras en diferentes días de muestreo (días transcurridos desde su elaboración):

N° muestra	Día de muestreo	Características físico-químicas		Análisis sensorial			
		pH	a _w	Color ¹	Olor ¹	Textura ¹	Aspecto gel
1	8	3.50	0.994	1	1	1	Sin exudados
2	22	3.50	0.994	1	1	1	Sin exudados
3	36	3.55	0.994	1	1	1	Sin exudados
4	48	3.47	0.994	1	1	1	Sin exudados
5	59	3.45	0.994	1	1	1	Sin exudados
6	70	3.45	0.994	1	1	1	Sin exudados
7	80	3.35	0.994	1	1	1	Sin exudados
8	90	3.20	0.994	2	2	2	Sin exudados

¹Se han valorado el color, olor y textura en una escala del 1 al 5, correspondiendo 1: Muy bueno; 2: Bueno; 3: Aceptable; 4: Deficiente; 5: Rechazo

La evaluación sensorial no detecta ningún defecto asociado a lo largo de la vida útil.

4.2. Análisis laboratoriales: análisis de microorganismos indicadores de alteración.

La empresa realiza un estudio de los microorganismos indicadores de alteración de su producto, siguiendo los siguientes criterios:

Microorganismo	Plan de muestreo	Límite aceptación	Método analítico	Límite detección
Aerobios	N=1	500 ufc/g	ISO 4833-1:2013	< 10 ufc/g
Enterobacterias	N=1	10 ufc/g	ISO 21528-2:2017	< 10 ufc/g
Mohos y levaduras	N=1	10 ufc/g	ISO 21527-1:2008	< 10 ufc/g

Se han analizado un total de 8 muestras en diferentes días de muestreo (días transcurridos desde su elaboración), obteniéndose los siguientes resultados:

Nº muestra	Día de muestreo	Análisis microorganismos			Resultado
		Aerobios	Enterobacterias	Mohos y levaduras	
1	8	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Conforme
2	22	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Conforme
3	36	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Conforme
4	48	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Conforme
5	59	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Conforme
6	70	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Conforme
7	80	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Conforme
8	90	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Conforme

Los análisis microbiológicos han sido satisfactorios, obteniéndose resultados por debajo de los límites establecidos en todas las muestras analizadas tras 90 días de almacenamiento.

4.3. Histórico de datos

Los resultados analíticos de la familia: gelatinas (de diferentes sabores) para gérmenes indicadores de alteración son los siguientes:

Año	Aerobios mesófilos		Enterobacterias		Mohos y levaduras	
	Nº muestras	Resultados	Nº muestras	Resultados	Nº muestras	Resultados
2018	1297	<500 ufc/g	1297	<10 ufc/g	1297	<10 ufc/g
2019	849	<500 ufc/g	849	<10 ufc/g	849	<10 ufc/g

Se ha calculado el intervalo de confianza para los resultados analíticos obtenidos sobre producto de los microorganismos indicadores de alteración, con un nivel de confianza del 95%. Así, tras introducir en la herramienta BIOQURA (<https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>) el número total de muestras analizadas (2146 muestras) y el número de muestras positivas (0), se ha obtenido un límite superior del intervalo de confianza de 0.001. Así, al ser éste inferior a 0.05 se concluye que el histórico de datos aportado es suficiente para justificar la vida útil del producto.

CONCLUSIONES

Se procede a establecer una vida útil de 60 días. Para aumentar la fiabilidad de los resultados, se realizarán analíticas periódicas de producto (n=1) siguiendo las mismas pautas de almacenamiento.

CASO PRÁCTICO: LECHUGA IV GAMA

Información general del producto:

Se trata de lechuga fresca troceada y lista para el consumo con una vida útil estimada de 10 días en base a un estudio sensorial de calidad organoléptica. No se le adiciona ningún conservante. El producto se distribuye a establecimientos de venta al por menor ubicados en toda España.

Las principales medidas de control que se aplican durante el proceso y que van a influir en la vida útil del producto son: la higienización y el envasado en atmósfera protectora.

A continuación se representa un diagrama que representa el flujo de dichas operaciones:



ETAPA 1: DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y PROCESO

NOMBRE DEL PRODUCTO: ENSALADA LISTA PARA CONSUMIR

Nº Rev.: 001

Fecha última revisión: 30-07-2019

- **INGREDIENTES:** Lechuga batavia (*Lactuca salitva* L.)
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** color verde intenso, textura crujiente. Olor y sabor propios de la hortaliza.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** pH 6.14 y a_w 0.95.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** pre-acondicionado, higienización, aclarado, secado, envasado en atmósfera protectora.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** *E. coli*.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** *L. monocytogenes* y *Salmonella*.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** *C. botulinum* no proteolítico.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** Envasado en bolsas de polietileno y poliamida, en atmósfera protectora (5% O₂, 20% CO₂ y 75% N₂). Se comercializa en raciones individuales, formato de 100g. Embalado en cajas de cartón.
- **ETIQUETADO:** Fuente de fibra.
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** Protegido de la luz solar. Mantener a 4°C.
- **CONDICIONES DE USO Y MANTENIMIENTO:** Alimento listo para el consumo. Abrir el envase, aliñar al gusto y consumir. Una vez abierto el envase consumir en 24 horas manteniéndolo en refrigeración.
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general.

ETAPA 2: IDENTIFICAR LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

Se trata de un alimento listo para el consumo cuyas características físico-químicas (pH 6.14 y a_w 0.95) permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*, por lo que este patógeno puede ser una causa probable de pérdida de seguridad del producto.

Por otro lado, *C. botulinum* es un patógeno relevante en los alimentos envasados en atmósferas protectoras con baja concentración de O₂ y suele presentar una prevalencia elevada en frutas y hortalizas al ser ubicuo y resistir en el ambiente, como por ejemplo en la tierra, suelos, cultivos, abonos orgánicos, etc. Por ello, dadas las características físico-químicas del alimento, las cepas no proteolíticas de *C. botulinum* podrían desarrollarse sobre el producto y producir toxina, por lo que este patógeno podría también ser una causa probable de pérdida de seguridad del producto durante su vida útil y va a considerarse en el estudio.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O FECHA DE CONSUMO PREFERENTE

Una vez identificada la causa probable de pérdida de seguridad del producto, es necesario determinar cómo va a marcarse la vida útil: fecha de caducidad o fecha de consumo preferente. Para ello, se podrá recurrir al árbol de decisiones establecido en la figura 7 de la guía.

PASO 1: ¿Es un producto estable a T^a ambiente? No, requiere refrigeración para su comercialización.

PASO 2: ¿Es un producto congelado? No, el producto debe almacenarse y distribuirse a 4°C.

PASO 3: ¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, dando lugar a un alimento nocivo? Sí, las características físico-químicas del producto (pH 6.14 y a_w 0.95) permiten su crecimiento, tal y como establece la nota 8, del Anexo I, Capítulo 1, del Reglamento (CE) No 2073/2005, de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Por ello, procede marcar la vida útil de este producto como fecha de caducidad.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL: HERRAMIENTAS.

76

La empresa aporta estudio del histórico de datos y ha realizado un estudio de microbiología predictiva.

4.1. Histórico de datos

La empresa presenta el siguiente histórico de datos de los últimos 3 años. Los análisis microbiológicos de producto se han realizado al final de su vida prevista.

Nº muestra	Características físico-químicas		Análisis microbiológico producto	
	pH	a_w	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. botulinum</i>
1	6,14	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
2	6,11	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
3	6,14	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
4	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
5	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
6	6,14	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
7	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
8	6,14	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
9	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)

10	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
11	6,11	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
12	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
13	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
14	6,12	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
15	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
16	6,14	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
17	6,14	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
18	6,11	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
19	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
20	6,12	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
21	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
22	6,13	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
23	6,13	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
24	6,11	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
25	6,10	0,95	Ausencia en 25g	< Limite Detección (< 10 ufc/g)

La empresa emplea la herramienta facilitada por la red Bioqura, disponible en el siguiente enlace: <https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>, para el cálculo de la significancia estadística de los resultados microbiológicos obtenidos sobre producto. A continuación se muestra una imagen de los resultados mostrados por dicha herramienta.

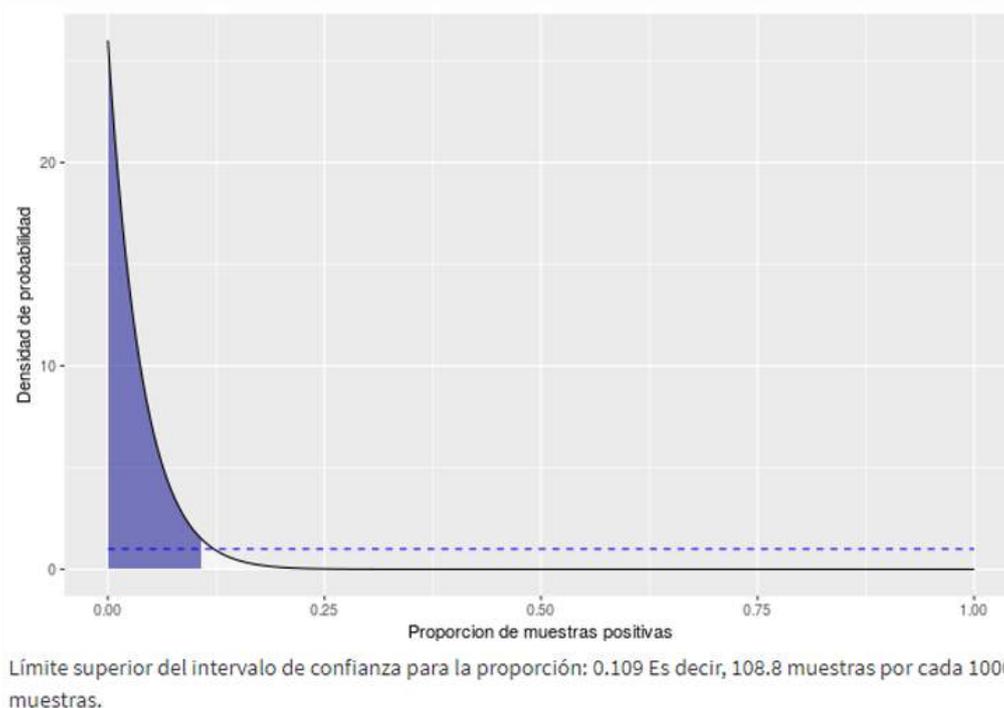
Resumen de las observaciones

Número de muestras positivas

Número de muestras negativas

Nivel de confianza

Resultado del test



78

Tras introducir el valor del número de muestras positivas a *L. monocytogenes* y *Clostridium botulinum* respecto al total de muestras analizadas, la herramienta concluye que el límite superior del intervalo de confianza para la proporción es de 0.109, es decir, que por cada 1000 muestras analizadas 108.8 muestras estarían no conformes, con un nivel de confianza de 95%.

El límite superior del intervalo de confianza se considera inaceptable al ser superior a 0.05. Por ello, el histórico de datos aportado no es estadísticamente significativo, no pudiendo garantizar, por sí solo, que el producto será inocuo durante toda su vida útil. Es por tanto necesario recurrir a métodos complementarios para validar la vida útil de este producto.

4.2. Microbiología predictiva

La empresa realiza un estudio de microbiología predictiva, utilizando el modelo predictivo *ComBase Predictor* (www.combase.cc), y empleando los resultados más desfavorables obtenidos en el histórico de datos:

- pH 6.14
- a_w : 0.95
- 20% CO₂
- *C. botulinum*: al haber obtenido todos los resultados: < límite detección (< 10 ufc/g), se considera el caso más desfavorable, es decir, que hay un nivel inicial de 10 ufc/g (1 log ufc/g).

- *L. monocytogenes*: al haber obtenido todos los resultados ausencia en 25g, se considera en el estudio que el nivel inicial de contaminación de *Listeria monocytogenes* es de 1 ufc/g (0 log ufc/g), al ser este el nivel mínimo de contaminación que permite el programa para hacer la predicción.

En relación al perfil de temperaturas a emplear en el estudio, la empresa no dispone de datos sobre la temperatura real a la que se encuentra el producto durante todas las etapas de distribución y almacenamiento así como el tiempo de permanencia en cada una de las etapas. Por ello, deciden utilizar los valores de referencia establecidos por la *EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT for conducting shelf-life studies on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*, para productos con una vida útil estimada < 21 días, expuestos a continuación:

Etapas de la cadena	Temperatura	Duración
Desde la fábrica hasta la llegada al expositor de venta	7 °C	1/3 de la vida útil total estimada: 10 días (80 horas)
Minorista: expositor de venta	7 °C	1/3 de la vida útil total estimada: 10 días (80 horas)
Conservación por el consumidor	12 °C	1/3 de la vida útil total estimada: 10 días (80 horas)

Tras introducir todos los datos del producto en el modelo predictivo ComBase Predictor, y eliminando la fase de latencia al tratarse del escenario más desfavorable, se obtienen los resultados mostrados a continuación:

Growth Model

[Static | **Dynamic**] [Aw | NaCl]

Time(h)	Temp (°C)
0.00	4.00
80.00	7.00
160.00	7.00
240.00	12.00

Listeria monocytogenes/innocua (CO2)

Temperatures range [1,40]

Init. level: 0.00

Phys.state: 1

pH: 6.14

Aw: 0.95

CO2(%): 20

Clostridium botulinum (non-prot.)

Temperatures range [4,30]

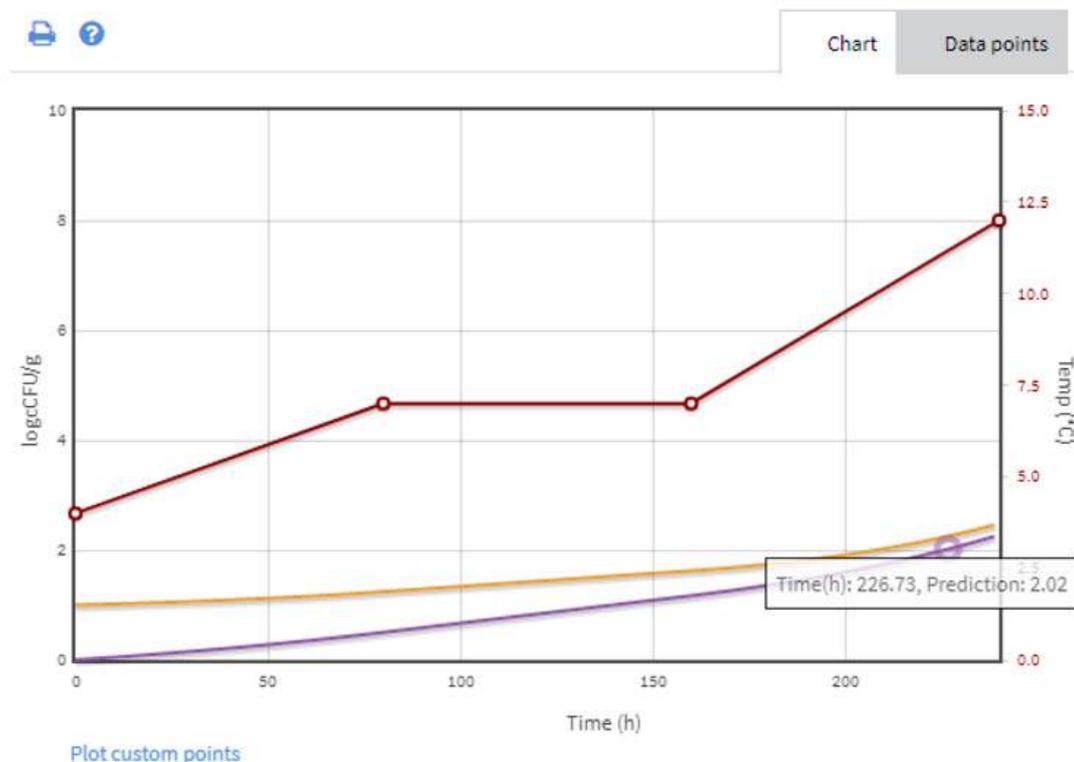
Init. level: 1

Phys.state: 1

pH: 6.14

Aw: 0.974

[Add prediction]



Tal y como puede observarse en la predicción realizada, *L. monocytogenes*, representada en color morado, alcanzaría niveles de 100 ufc/g (2 log ufc/g) a las 226.73 horas (9.4 días).

En relación a *C. botulinum* no proteolítico, representado en color amarillo, en el 9º día de predicción no se observa un incremento significativo en el número de células, siendo por tanto, poco probable que produzca toxina botulínica sobre el producto durante dicho periodo. Del mismo modo, según las recomendaciones realizadas por FSA (2017) se considera seguro establecer una vida útil ≤ 10 días en relación a dicha bacteria (véase tabla 3 de la presente guía). Por ello, en el caso en que nos ocupa se consideraría adecuado establecer una vida útil de 9 días.

CONCLUSIONES

- La empresa realizó un estudio sensorial de calidad sobre de este producto, concluyendo que el producto conserva sus atributos de calidad óptima durante 10 días.
- El estudio realizado con microbiología predictiva ha demostrado que, en las condiciones más desfavorables, *L. monocytogenes* alcanza niveles inaceptables a los 9.4 días.
- Por ello, a la vista de los resultados obtenidos la empresa modifica la vida útil estimada para este producto, reduciéndola de 10 días a 9 días. No obstante, la vida útil estimada debe revisarse ante la obtención de nuevos datos, como por ejemplo resultados microbiológicos de producto.

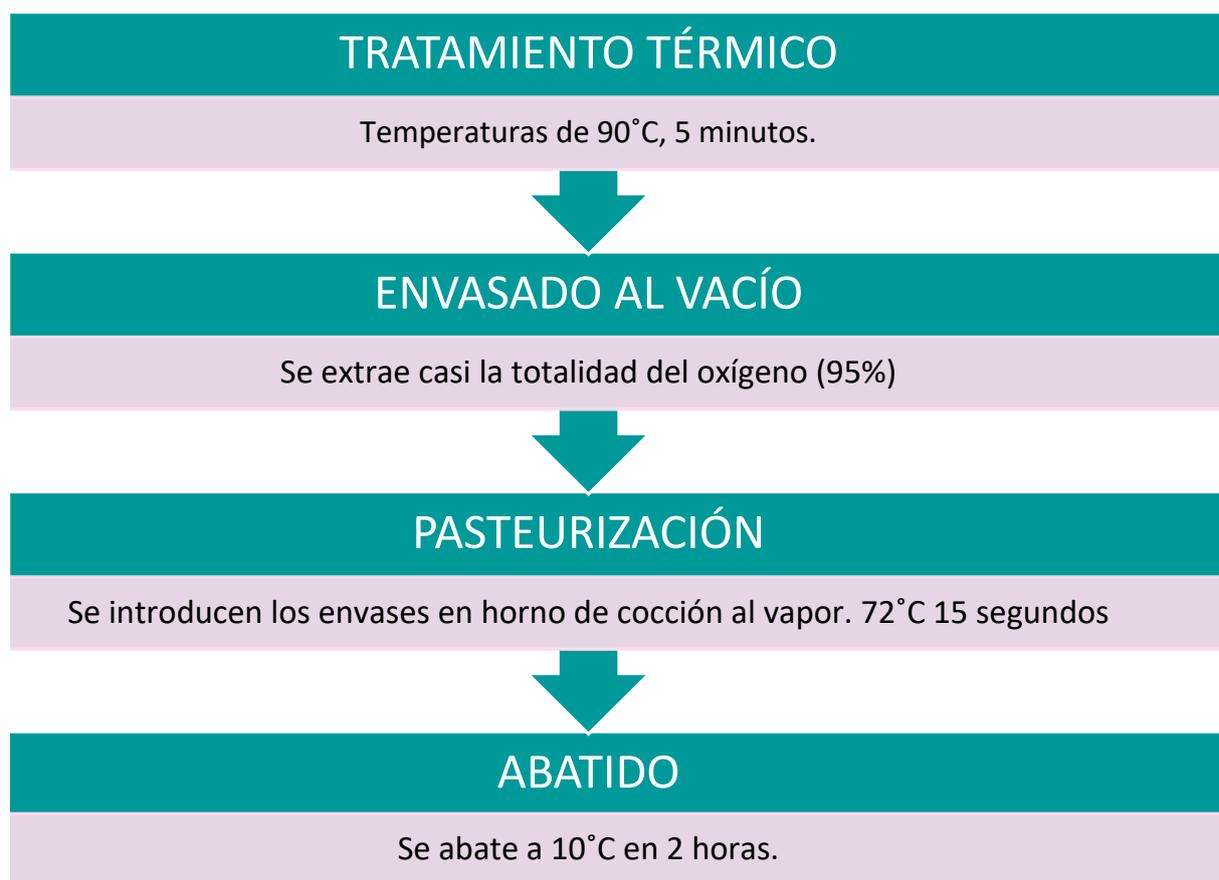
CASO PRÁCTICO: CARACOLES EN SALSA

Información general del producto:

Se trata de caracoles en salsa con ingredientes de origen animal (caracoles, jamón curado) y vegetal (tomate, cebolla, especias, etc.). No se le adiciona ningún conservante. El producto se distribuye a establecimientos de venta al por menor ubicados en un radio de unos 240 km (3-4 horas de trayecto).

Las principales medidas de control que se aplican durante el proceso y que van a influir en la vida útil del producto son: cocción, envasado al vacío, pasteurización y abatido.

A continuación se representa un diagrama que representa el flujo de dichas operaciones:



ETAPA 1: DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y PROCESO

NOMBRE DEL PRODUCTO: CARACOLES EN SALSA

Nº Rev.: 3

Fecha última revisión: 26-01-20

- **INGREDIENTES:** caracoles, jamón curado, cebolla, tomate, ajo, laurel, especias.
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** color, aspecto, olor, sabor y textura propias de la preparación culinaria.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** pH 5.6 y a_w 0.99.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** tratamiento térmico, envasado vacío, pasteurización y abatido.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** Ninguno.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** *L. monocytogenes*.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** *C. botulinum* no proteolítico.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** Envasado en bolsas de polietileno y poliamida, al vacío. Se comercializa en raciones individuales, formato de 200g. Embalado en cajas de cartón.
- **ETIQUETADO:** "Sin gluten". No declara ninguna propiedad nutricional ni saludable.
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** Protegido de la luz solar. Mantener a 4°C.
- **CONDICIONES DE USO Y MANTENIMIENTO:** Alimento listo para el consumo. Abrir el envase, calentar en microondas y consumir. Una vez abierto el envase consumir en 24 horas.
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general.

ETAPA 2: IDENTIFICAR LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

Se trata de un alimento listo para el consumo cuyas características físico-químicas favorecen el crecimiento de *Listeria monocytogenes* por lo que esta bacteria podría ser una causa probable de pérdida de seguridad del producto durante su comercialización. Sin embargo, dado que se somete a un tratamiento listericida (pasteurización) en su envase final, y no existe por tanto posibilidad de recontaminación con esta bacteria, este alimento está exento de realizar pruebas regulares de *L. monocytogenes*, tal y como establece el Reglamento (CE) N° 2073/2005. Por ello, este patógeno no se considera relevante para la vida útil de este producto.

Estudios recientes han puesto de manifiesto una tendencia ascendente en la prevalencia de *Clostridium botulinum* en alimentos listos para el consumo envasados al vacío o en atmósfera protectora. Se trata de un microorganismo ubicuo, persistente en el ambiente y resistente a la mayoría de desinfectantes.

Ninguno de los tratamientos térmicos aplicados durante el proceso garantiza la destrucción de las formas esporuladas, ya que se destruyen con tratamientos térmicos de 90°C, 10 minutos o equivalentes. El proceso de abatido permite reducir la germinación de las formas esporuladas, al provocar un descenso rápido de la temperatura del alimento. Sin embargo, dicha medida no controla el peligro de germinación a lo largo de la vida útil ya que los factores que principalmente interfieren son la disponibilidad de nutrientes en el alimento, como aminoácidos o azúcares. Así, según diferentes estudios, la presencia de L-alanina y aminos inducen la germinación de las formas esporuladas.

Por ello, dado que las características extrínsecas e intrínsecas del producto permiten el desarrollo de este patógeno, la vida útil del producto podría estar limitada por el crecimiento *C. botulinum* y formación de toxina botulínica.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O FECHA DE CONSUMO PREFERENTE

Una vez identificada la causa probable de pérdida de seguridad del producto, es necesario determinar cómo va a marcarse la vida útil: fecha de caducidad o fecha de consumo preferente. Para ello, se podrá recurrir al árbol de decisiones establecido en la figura 7 de la guía.

PASO 1: *¿Es un producto estable a T^a ambiente? No, requiere refrigeración para su comercialización.*

PASO 2: *¿Es un producto congelado? No, el producto debe almacenarse y distribuirse a 4°C.*

PASO 3: *¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, dando lugar a un alimento nocivo? No, el producto se somete a una pasteurización en su envase final eficaz para eliminar este microorganismo, sin posibilidad de recontaminación.*

PASO 4: *¿Puede permitir la formación de histamina o el crecimiento de *C. botulinum* no proteolítico hasta niveles inaceptables, dando lugar a un alimento nocivo? Sí, no existe ninguna etapa que garantice la destrucción de las formas esporuladas de *C. botulinum* y las características intrínsecas y extrínsecas del producto permiten su crecimiento y formación de toxina.*

Por ello, procede marcar la vida útil de este producto como fecha de caducidad.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL: HERRAMIENTAS.

La empresa aporta histórico de datos de los últimos 3 años. Así mismo, ha realizado un estudio de microbiología predictiva y un análisis sensorial.

4.1. Histórico de datos

La empresa presenta el siguiente histórico de datos de los últimos 3 años:

Nº muestra	Características físico-químicas		Análisis <i>Clostridium sulfito reductores</i>	
	pH	a _w	Superficies	Producto final
1	5.6	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
2	5.5	0.99	Presencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
3	5.6	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
4	5.6	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
5	5.6	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
6	5.6	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
7	5.5	0.99	Presencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
8	5.5	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
9	5.4	0.99	Ausencia	10 ufc/g
10	5.5	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
11	5.6	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
12	5.6	0.99	Presencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
13	5.6	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)
14	5.6	0.99	Ausencia	10 ufc/g
15	5.6	0.99	Ausencia	< Limite Detección (< 10 ufc/g)

4.2. Microbiología predictiva

La empresa realiza un estudio de microbiología predictiva, utilizando el modelo predictivo *ComBase Predictor* (www.combase.cc), y empleando los resultados más desfavorables obtenidos en el histórico de datos:

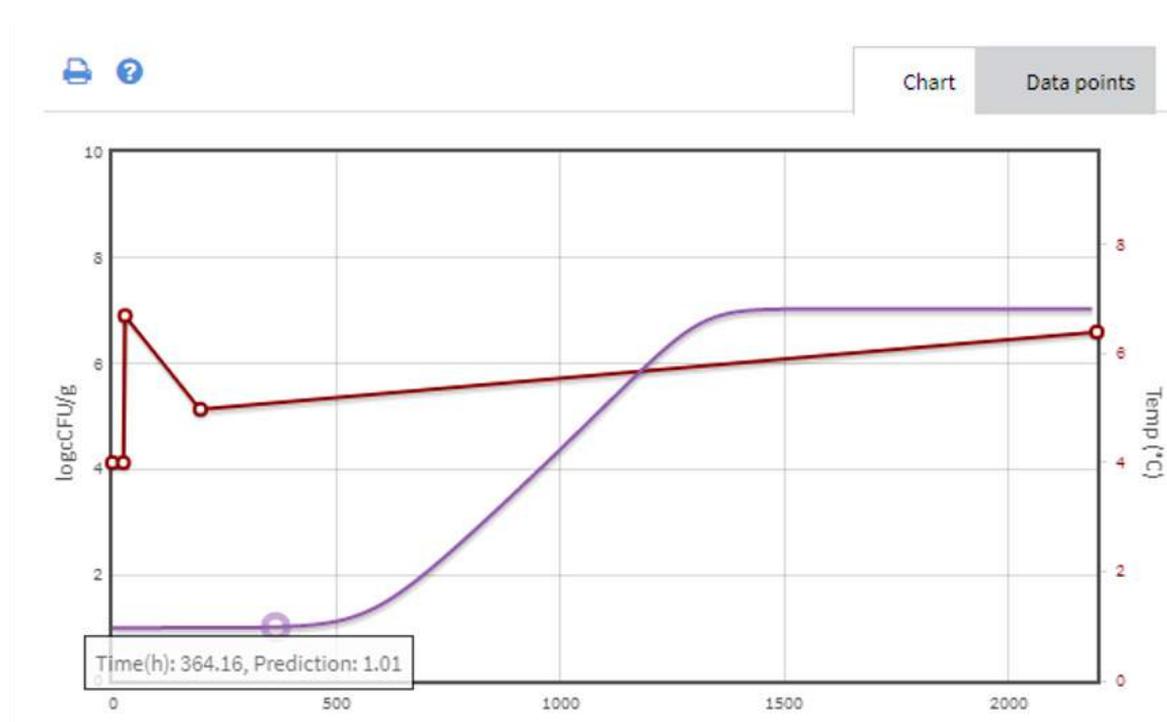
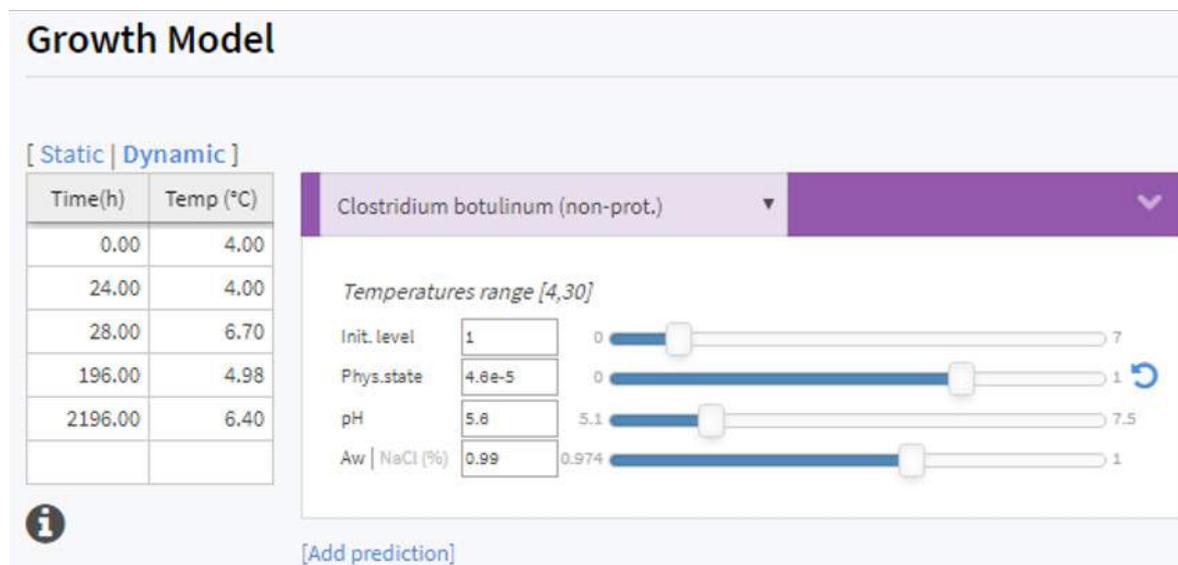
- pH 5.6
- aw: 0.99
- Contaminación inicial: 10 ufc/g (1 log ufc/g)

En relación al perfil de temperaturas empleados en el estudio, la empresa aporta la siguiente tabla, que muestra los valores de temperatura registrados por la empresa durante la comercialización del producto así como la duración de cada de una de las etapas de comercialización.

Etapas	Temperatura (desviación estándar)	Tiempo permanencia
Almacenamiento industria	4,0 °C ((± 0 °C)	24 horas
Distribución	6,7 °C (± 1,6 °C)	4 horas
Exposición en establecimiento menor	4,98 °C (± 2,9 °C)	168 horas
Frigorífico doméstico	6,4 °C (± variable según posición de la sonda en el frigorífico)	2000 horas

Tras introducir todos los datos del producto en el modelo predictivo ComBase Predictor, y manteniendo la duración de la fase de latencia según lo establecido por defecto en el programa (al tratarse de un escenario realista), obtiene los resultados mostrados en la siguiente figura.

Es necesario indicar que, las cepas de *C. botulinum* no proteolíticas comienzan a producir la toxina botulínica al final de la fase de crecimiento exponencial e inicio de la fase estacionaria. Por ello, tal y como puede observarse, el estudio predictivo realizado pone de manifiesto que a partir de los 23 días (551.76 horas) *C. botulinum* podría comenzar a producir toxina botulínica, siempre teniendo en cuenta todas las circunstancias descritas durante el estudio.



4.3. Análisis sensorial

La empresa ha realizado un análisis sensorial del producto. Para ello, ha evaluado diferentes parámetros organolépticos (color, olor, textura y sabor) tras almacenar el producto durante 1 mes en un frigorífico doméstico ubicado en sus propias instalaciones (temperaturas medias de 6.4°C).

El panel de cata que llevó a cabo el análisis sensorial estaba integrado por personal de la empresa: 2 técnicos de calidad, 2 personal administrativo, 1 personal directivo, 3 personal planta y 2 personal de contabilidad.

El estudio se llevó a cabo en 5 lotes diferentes del producto, siguiendo el modo de empleo indicado en el envase. Los resultados obtenidos en el estudio fueron:

FECHA	LOTE	RESULTADOS*			
		Color	Textura	Olor	Sabor
15/11/2019	191015	5	4.5	4.5	5
22/11/2019	191022	4.5	5	5	5
29/11/2019	191029	5	4.5	5	5
03/12/2019	191103	4.5	5	5	5
12/12/2019	191112	5	5	4.5	4.5

Criterios de puntuación: COLOR: (1) negruzco (2) marrón oscuro (3) pardo (4) teja (5) naranja amarillento; SABOR (1) rancio (2) amargo (3) ligeramente amargo (4) típico del producto, menos intenso (5) Típico del producto, intenso; OLOR (1) ácido, intensamente fermentado (2) ácido (3) ligeramente ácido (4) típico del producto, menor intensidad (5) intenso olor típico del producto; TEXTURA (1) completamente reblandecida (2) reblandecida (3) ligeramente reblandecida (4) ligera pérdida de consistencia de a carne (5) consistencia típica del producto.

**Valores medios obtenidos por el panel de cata*

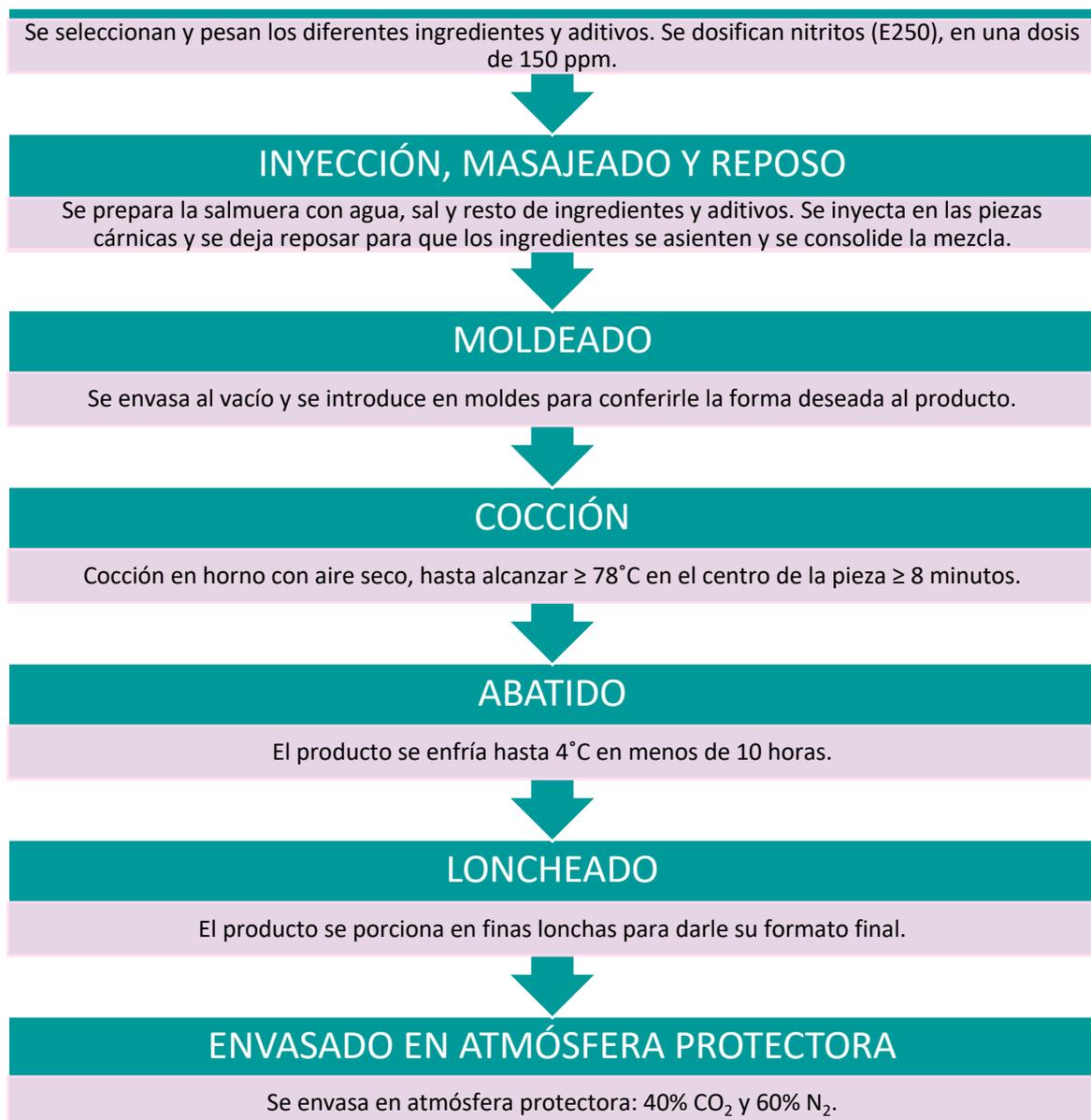
CONCLUSIÓN

- El análisis sensorial ha puesto de manifiesto que el producto conserva sus características organolépticas propias durante un periodo de al menos 30 días.
- El estudio de microbiología predictiva ha demostrado que, en las condiciones más desfavorables, *C. botulinum* no proteolítico podría alcanzar niveles inaceptables y, por tanto, comenzar a producir toxina botulínica, a los 23 días desde la fecha de fabricación.
- Por ello, la empresa decide establecer la vida útil de su producto "caracoles en salsa" en 21 días.

CASO PRÁCTICO: JAMÓN COCIDO LONCHEADO

Información general del producto:

La empresa ha desarrollado un nuevo producto y necesita establecer su vida útil antes de comercializarlo. Se trata de un producto cárnico cocido, loncheado y listo para el consumo. Se le adicionan nitritos para su conservación y para estabilizar el color del producto. El producto se distribuye a establecimientos de venta al por menor ubicados en toda España. A continuación se representa un diagrama que representa el flujo de dichas operaciones:



ETAPA 1: DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y PROCESO

NOMBRE DEL PRODUCTO: GAZPACHO ANDALUZ

Nº Revisión: 001

Fecha última revisión: 25-06-19

- **INGREDIENTES:** agua, tomate, pan (harina de trigo, agua, sal, levadura), pimiento verde, pimiento rojo, cebolla, ajo, sal, aceite de oliva, vinagre, sal, pimienta y acidulante (E330).
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** color rojo intenso, textura líquida, ligeramente ácido. Olor y sabor propios del producto.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** pH 4, a_w 0.99.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** desinfección de vegetales con cloro (80 ppm) durante 10 minutos; acidificación del producto con ácido cítrico (E330).
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** *Escherichia coli*.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** ninguno.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** Envasado en botellas de polietileno. Se comercializa en raciones individuales (250 ml) y en formato familiar (1 litro). Cierre hermético mediante tapón de rosca. Embalado en cajas de cartón.
- **ETIQUETADO:** no realiza declaración de propiedad nutricional o saludable.
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** Proteger de la luz solar. Mantener a temperatura inferior a 4°C.
- **CONDICIONES DE USO Y MANTENIMIENTO:** Alimento listo para el consumo. Agitar y consumir. Una vez abierto consumir en 24 horas y mantener en refrigeración.
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general salvo intolerantes al gluten.

ETAPA 2: IDENTIFICAR LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

Se trata de un alimento listo para el consumo cuyas características físico-químicas (pH 6 y a_w 0.95) permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*, por lo que este patógeno puede ser una causa probable de pérdida de seguridad del producto.

Además, dadas las características físico-químicas del producto puede favorecer el desarrollo de microorganismos causantes de alteración que podrían limitar la vida útil del producto antes de que *L. monocytogenes* alcance niveles inaceptables.

Por otro lado, a pesar de que *C. botulinum* es un patógeno relevante en los alimentos envasados al vacío o en atmósferas protectoras con baja concentración de O_2 , la concentración de nitritos empleada en el alimento (150 ppm) junto con el mantenimiento en refrigeración del producto inhibe su crecimiento. Por ello, *C. botulinum* no se considerará relevante para la vida útil de este producto siempre y cuando la etapa de dosificación de aditivos se encuentre bajo control.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O FECHA DE CONSUMO PREFERENTE

Una vez identificada la causa probable de pérdida de seguridad del producto, es necesario determinar cómo va a marcarse la vida útil: fecha de caducidad o fecha de consumo preferente. Para ello, se podrá recurrir al árbol de decisiones establecido en la figura 7 de la guía.

PASO 1: *¿Es un producto estable a T^a ambiente?* No, requiere refrigeración para su comercialización.

PASO 2: *¿Es un producto congelado?* No, el producto debe almacenarse y distribuirse entre 0 y 5°C.

PASO 3: *¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, dando lugar a un alimento nocivo?* Sí, las características físico-químicas del producto (pH 6 y a_w 0.95) podrían permitir su crecimiento, tal y como establece la nota 8, del Anexo I, Capítulo 1, del Reglamento (CE) No 2073/2005, de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Por ello, procede marcar la vida útil de este producto como fecha de caducidad.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL: HERRAMIENTAS.

Se trata de un nuevo producto, por lo que no se dispone de histórico de datos referentes, por ejemplo, al estudio de reclamaciones y quejas, análisis de tendencias o a la contaminación microbiológica de materias primas, superficies y producto final (biota patógena y/o alterante, carga microbiana, etc.).

Por ello, la empresa decide no emplear la microbiología predictiva o los ensayos de durabilidad como herramientas para establecer la vida útil de su producto ya

que, para llevar a cabo una predicción del crecimiento microbiológico es necesario conocer la contaminación inicial del microorganismo objeto del estudio y, del mismo modo, para llevar a cabo un estudio de durabilidad es necesario partir de productos en los que se haya detectado una prevalencia y un nivel de contaminación inicial medio-elevado.

La empresa aporta literatura científica y ha realizado un estudio de desafío para evaluar el crecimiento de *L. monocytogenes* sobre el producto. También, la empresa ha realizado un análisis sensorial del producto que pone de manifiesto que conserva sus características organolépticas propias durante la vida útil prevista (42 días).

4.1. Literatura científica

La EFSA emitió un dictamen científico en el que se indica que en productos cárnicos con bajo contenido en sal y una vida útil prolongada la adición de nitritos en concentraciones de 50 - 150 ppm inhiben el crecimiento de *C. botulinum* y la producción de la toxina botulínica (EFSA, 2003). Por ello, *C. botulinum* no se considera un patógeno relevante para la vida útil de este producto.

4.2. Análisis sensorial

La empresa ha realizado un análisis sensorial del producto. Para ello, ha evaluado diferentes parámetros organolépticos (color, olor, textura y sabor) tras almacenar el producto durante 42 días en un frigorífico doméstico ubicado en sus propias instalaciones (temperaturas medias de 7°C).

El panel de cata que llevó a cabo el análisis sensorial estaba integrado por personal de la empresa: 2 técnicos de calidad y 3 personal planta.

El estudio se llevó a cabo en 3 lotes diferentes del producto. A continuación se describen los resultados obtenidos en el estudio sensorial.

FECHA	LOTE	RESULTADOS*			
		Color	Textura	Olor	Sabor
20/09/2019	JC012019	5	4.5	4.5	4
21/09/2019	JC022019	4.5	5	4	4
22/09/2019	JC032919	5	4.5	5	4

Criterios de puntuación: (1) muy deficiente (2) rechazo (3) aceptable (4) bueno (5) muy bueno.

4.3. Ensayo de desafío (Challenge test)

La empresa presenta los resultados de un ensayo de desafío llevado a cabo en un laboratorio de análisis de alimentos. El informe del ensayo de desafío presenta las siguientes características:

ENSAYO DE DESAFÍO PARA POTENCIAL DE CRECIMIENTO	
Número de informe:	00001X
Objetivo del estudio:	<ul style="list-style-type: none"> □ Evaluar y cuantificar el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> sobre el jamón cocido loncheado. □ Categorizar el producto en la categoría 1.2 o 1.3 del Reglamento (CE) No 2073/2005 según si permite o no el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>. □ Establecer una vida útil segura en relación con dicha bacteria. □ Si procede, establecer un límite microbiológico intermedio para <i>L. monocytogenes</i>.
Tipo de test de desafío:	de potencial de crecimiento
Descripción completa del alimento:	<ul style="list-style-type: none"> □ Nombre del producto: Jamón cocido loncheado □ Características (pH, a_w, microbiota asociada, etc.): pH 6.0, a_w 0.95, nitritos 150 ppm, envasado en atmósfera protectora (40% CO₂; 60% N₂). □ Vida útil prevista: 42 días □ Identificación de lotes muestreados: se muestrea el lote 001, 002 y 003. □ Fechas de inicio de la vida útil: 01-06-19 (lote 001); 02-06-19 (lote 002) y 03-06-19 (lote 003).
Información relativa al test de desafío:	<ul style="list-style-type: none"> □ Número de lotes muestreados y justificación: De acuerdo a la guía técnica, en los casos en los que hay una baja variabilidad de las características físico-químicas entre lotes (pH, a_w) y empleando la microbiología predictiva la probabilidad de que crezca <i>L. monocytogenes</i> sea < 10%, se podrá analizar un solo lote de producción. En caso contrario, por defecto es necesario analizar al menos 3 lotes distintos. En este estudio, puesto que no se dispone de información sobre la variabilidad de los lotes y probabilidad de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>, se analizaron 3 lotes distintos de jamón cocido loncheado. □ Número de unidades muestreadas por lote y por día de análisis: se analizaron 3 muestras por lote, según plan de muestreo especificado por la guía técnica.

<p>□ Masa o volumen del alimento inoculado: en cada muestra se inocularon dos lonchas de jamón cocido (15 g aproximadamente/loncha; cantidad total inoculada 30 g).</p>
<p>□ Cepas inoculadas: De acuerdo a la guía técnica, es necesario inocular al menos 2 cepas distintas de <i>L. monocytogenes</i>: Una de características de crecimiento conocidas y la otra se puede elegir libremente, por ejemplo, puede ser una cepa aislada en la empresa alimentaria (producto, superficies, materias primas, etc.). En este estudio, se inoculó un mix compuesto por 2 cepas distintas de <i>L. monocytogenes</i>, obtenidas del EURL Lm: cepa 12MOB045LM y cepa 12MOB046LM. Se eligieron estas cepas atendiendo a su capacidad de desarrollo sobre productos cárnicos con a_w de 0.95 y valores de pH de hasta 5.</p>
<p>□ Características de las cepas y justificación de su elección: se han escogido estas cepas ya que diversos estudios las aislaron en productos cárnicos y su capacidad de crecimiento ha sido testada bajo diferentes condiciones. Se adjuntan fichas descriptivas de las cepas.</p>
<p>□ Preparación del inóculo: cada cepa fue cultivada por separado. En primer lugar se cultivaron en caldo BHI a 37°C durante 24 horas y posteriormente se cultivaron en caldo BHI a 10°C durante 5 días. Finalmente, se preparó un mix en el que cada cepa se encontraba en cantidades iguales (50:50).</p>
<p>□ Concentración del inóculo: Se realizaron varias diluciones del mix de cepas de <i>L. monocytogenes</i>: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} y 10^{-4}.</p>
<p>□ Volumen del inóculo inoculado por unidad muestreada: el volumen del inóculo empleado fue de un 1% (p/v) de la masa de jamón cocido muestreada. Así se alcanzaron concentraciones ≈ 100 ufc/g.</p>
<p>□ Método de contaminación: De acuerdo a la guía técnica, la inoculación puede hacerse en profundidad o en superficie. La inoculación en profundidad debe realizarse en productos que se consideren homogéneos (alimentos que han sido sometidos a un picado, amasado, etc.). La inoculación en superficie debe realizarse en los casos en los que se quiera simular una contaminación en una parte específica del procesado. En este estudio, la inoculación se ha realizado en superficie para simular una contaminación del alimento durante la etapa de loncheado. Una vez inoculadas, se envasaron en atmósfera protectora siguiendo el procedimiento habitual establecido por la empresa.</p>

- **Día de inoculación:** Las muestras se inocularon el mismo día en que iniciaron la vida útil: el 01-06-19 (lote 001); el 02-06-19 (lote 002) y el 03-06-19 (lote 003).

- **Duración del test e intervalos de muestreo:** Según la guía técnica, el número mínimo de muestras a analizar por cada lote es:

Parámetro	Día 0	Día final
Recuento de <i>L. monocytogenes</i> en muestras inoculadas	3	3
Investigación de <i>L. monocytogenes</i> en muestras no inoculadas	3	3
Control gas envasado en muestras no inoculadas	1	1
Recuento de microbiota asociada en muestras no inoculadas		

En este estudio se inocularon 3 muestras por cada uno de los lotes muestreados, lote 001, 002 y 003. Se siguió el plan de muestreo indicado en la guía técnica.

- **Temperatura y duración de almacenamiento y justificación:** la empresa no dispone de información sobre la temperatura y duración de las distintas etapas de almacenamiento y distribución de su producto. Por ello, las muestras se incuban siguiendo los parámetros dados por defecto en la guía técnica para aquellos productos cuya vida útil estimada sea > 21 días:

- 7 días a 7°C.
- 17.5 días (1/2 (vida útil – 7 días)) a 7°C.
- 17.5 días (1/2 (vida útil – 7 días)) a 12°C.

- **Método analítico de detección y recuento utilizado:** Para el recuento de *L. monocytogenes* en las muestras inoculadas se ha empleado el método analítico EN/ISO 11290-1. Para la investigación de *L. monocytogenes* en las muestras no inoculadas se ha empleado el método analítico EN/ISO 11290-2.

- **Límites de recuento:** El límite de recuento de *L. monocytogenes* es 10 ufc/g.

- **Parámetros físico-químicos del alimento al inicio y al final del estudio:** al inicio del estudio (día 0) el producto presentaba pH 6 y a_w 0.95. Al final del estudio el pH era de 5.9 y la a_w de 0.95.

- **Atmósfera de envasado:** La composición de la atmósfera de envasado no ha variado durante el estudio, permaneciendo la siguiente composición: 40% CO₂; 60% N₂

- **Concentración de microbiota asociada al inicio y al final del estudio:**

Microorganismo	Día 0	Día final
Bacterias ácido-lácticas	< 10 ufc/g	100 ufc/g
Levaduras	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g

- **Concentración de *L. monocytogenes* al inicio y al final del estudio:**

Resultados del recuento de *L. monocytogenes* en muestras inoculadas:

Lote	Día muestreo	Recuento (log ufc/g)	Potencial de crecimiento (δ)
001	Día 0	2.05	2.99 – 2.07 = 0.92
		2.07	
		2.11	
	Día final	2.99	
		2.90	
		3.15	
002	Día 0	2.00	3.00 – 2.00 = 1.00
		1.90	
		2.17	
	Día final	3.00	
		2.90	
		3.22	
003	Día 0	2.05	3.05 – 2.15 = 0.9
		2.15	
		2.24	
	Día final	3.11	
		2.90	
		3.05	

Resultados de la investigación de *L. monocytogenes* en muestras no inoculadas:

Lote	Día muestreo	Recuento (log ufc/g)
001	Día 0	Ausencia/25g
		Ausencia/25g
		Ausencia/25g
	Día final	Ausencia/25g
		Ausencia/25g
		Ausencia/25g
002	Día 0	Ausencia/25g
		Ausencia/25g
		Ausencia/25g
	Día final	Ausencia/25g
		Ausencia/25g
		Ausencia/25g
003	Día 0	Ausencia/25g
		Ausencia/25g
		Ausencia/25g
	Día final	Ausencia/25g
		Presencia (1.17 log ufc/g)
		Ausencia/25g

□ Potencial de crecimiento calculado por lote:

- Lote 001: $\delta = 0.92$
- Lote 002: $\delta = 1.00$
- Lote 003: $\delta = 0.9$

□ **Conclusiones:**

- 1) El potencial de crecimiento calculado más desfavorable es de 1.00 (lote 002).
- 2) Al haber obtenido un potencial de crecimiento $\delta > 0.5$ log se concluye que este jamón cocido loncheado permite el crecimiento de *L. monocytogenes* y, por tanto, le aplica el criterio microbiológico establecido en el Reglamento (CE) No 2073/2005 para la categoría 1.2. "Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales".
- 3) Se realiza una estimación del crecimiento de *L. monocytogenes* para predecir si el producto excederá el límite de 100 ufc/g al final de su vida útil. Para ello, se ha realizado el siguiente cálculo, especificado en la guía técnica de referencia, y teniendo en cuenta que la contaminación detectada por la empresa durante las pruebas realizadas a este producto fue de 0.60 log ufc/g en producto final:

$$\text{Concentración final} = \text{concentración inicial} + \delta$$

$$\text{Concentración final} = 0.60 + 1.00 = 1.60 \text{ log ufc/g}$$

Por ello, se concluye que el producto no excederá los 100 ufc/g durante su vida útil estimada (42 días).

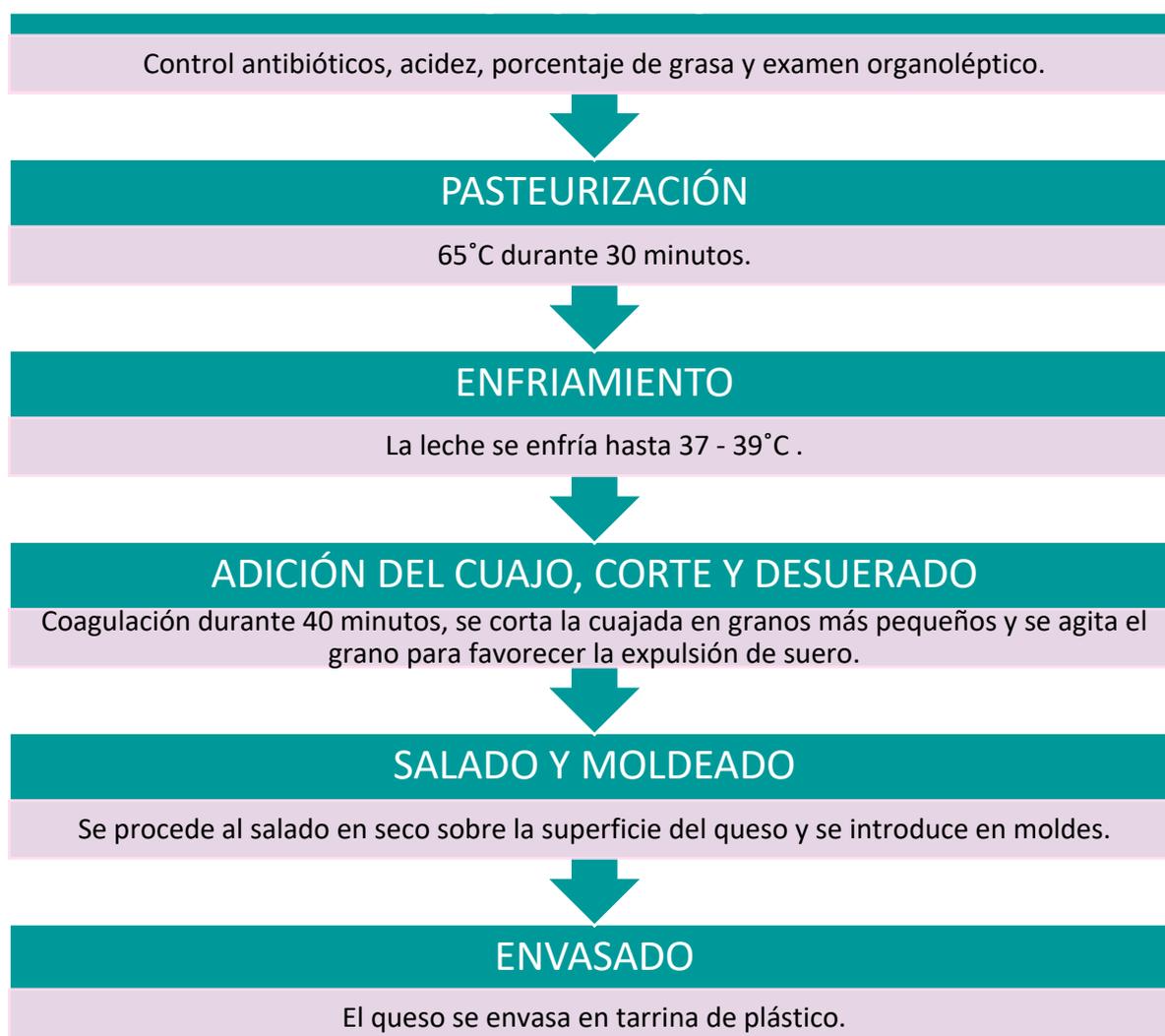
- 4) En base a los resultados obtenidos, la empresa puede fijarse un límite intermedio para *L. monocytogenes*. Así, se recomienda que al inicio de su vida útil, el jamón cocido loncheado que ha sido objeto de este estudio, no exceda la contaminación de 1 log ufc/g de *L. monocytogenes*.

CASO PRÁCTICO: QUESO FRESCO

Información general del producto:

Se trata de un queso fresco de cabra listo para el consumo. La empresa fabricante ha estado comercializando el producto durante varios meses sin disponer de estudio de vida útil por lo que las Autoridades Competentes han requerido que demuestre que el producto es seguro durante toda su vida útil, tal y como se especifica en la legislación vigente. El producto se distribuye a establecimientos de venta al por menor ubicados en la Comunitat Valenciana.

La principal medida de control que se aplica durante el proceso y que va a influir en la vida útil del producto es la pasteurización. A continuación se describe un diagrama que representa el flujo de las principales etapas de elaboración del queso fresco:



ETAPA 1: DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y PROCESO

NOMBRE DEL PRODUCTO: QUESO FRESCO

N° Rev.: 5

Fecha última revisión: 5-2-20

- **INGREDIENTES:** leche entera de cabra, cuajo líquido, cloruro de calcio y sal.
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** color blanco con tonos ligeramente amarillentos, superficie luminosa y brillante, textura elástica. Olor y sabor propios del producto lácteo.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** pH 6.77 – 6.80, a_w 0.99 y 0.29 – 0.31 g de NaCl /100 g.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** recepción de la leche, pasteurización (65°C, 30 minutos), enfriamiento (37-39°C), adición del cuajo, corte, desuerado, lavado de la cuajada, salado, moldeo, pesado, envasado y almacenado en refrigeración.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** *L. monocytogenes* y enterotoxina estafilocócica.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** *E. coli* y Estafilococos coagulasa positivo.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** ninguno.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** Envasado en tarrinas de plástico, en packs de 2 unidades de 250g cada uno (500 g).
- **ETIQUETADO:** Reglamento (UE) No 1169/2011 y Reglamento (CE) No 853/2004. La denominación de venta va acompañada del contenido en grasa.
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** Mantener entre 1 - 8°C.
- **CONDICIONES DE USO Y MANTENIMIENTO:** Alimento listo para el consumo. Abrir el envase y consumir.
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general excepto intolerantes a la lactosa.

ETAPA 2: IDENTIFICAR LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

Se trata de un alimento listo para el consumo cuyas características físico-químicas (pH 6.8 y a_w 0.99) podrían permitir el crecimiento de *L. monocytogenes*, por lo que este patógeno puede ser una causa probable de pérdida de seguridad del producto.

Por otro lado, el producto puede experimentar alteraciones organolépticas durante su vida útil, pudiendo ser ésta otra posible causa de pérdida de seguridad.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O FECHA DE CONSUMO PREFERENTE

Una vez identificada la causa probable de pérdida de seguridad del producto, es necesario determinar cómo va a marcarse la vida útil: fecha de caducidad o fecha de consumo preferente. Para ello, se podrá recurrir al árbol de decisiones establecido en la figura 7 de la guía.

PASO 1: ¿Es un producto estable a T^a ambiente? No, requiere refrigeración para su comercialización.

PASO 2: ¿Es un producto congelado? No, el producto debe almacenarse y distribuirse entre 1 y 8°C.

PASO 3: ¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, dando lugar a un alimento nocivo? Sí, las características físico-químicas del producto (pH 6.8 y a_w 0.99) podrían permitir su crecimiento, tal y como establece la nota 8, del Anexo I, Capítulo 1, del Reglamento (CE) No 2073/2005, de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Por ello, procede marcar la vida útil de este producto como fecha de caducidad.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL: HERRAMIENTAS.

Se trata de un producto que ha estado comercializándose durante 3 meses con una vida útil de 9 días en base a un estudio sensorial desarrollado en la empresa. Aunque en niveles bajos (10 ufc/g), se ha detectado prevalencia de *Listeria*.

La empresa decide emplear el histórico de datos y ensayo de durabilidad como herramientas para establecer la vida útil de su producto de forma segura.

4.1. Histórico de datos

Nº muestra	Características físico-químicas		Análisis <i>Listeria monocytogenes</i>	
	pH	a _w	Producto	Superficies
1	6.8	0.99	Ausencia en 25g	Presencia
2	6.77	0.99	Presencia (10 ufc/g)	Ausencia
3	6.8	0.99	Ausencia en 25g	Ausencia
4	6.79	0.99	Ausencia en 25g	Ausencia
5	6.8	0.99	Presencia (10 ufc/g)	Ausencia
6	6.8	0.99	Ausencia en 25g	Ausencia
7	6.8	0.99	Presencia (10 ufc/g)	Presencia
8	6.77	0.99	Ausencia en 25g	Presencia
9	6.79	0.99	Ausencia en 25g	Ausencia
10	6.8	0.99	Presencia (10 ufc/g)	Ausencia

100

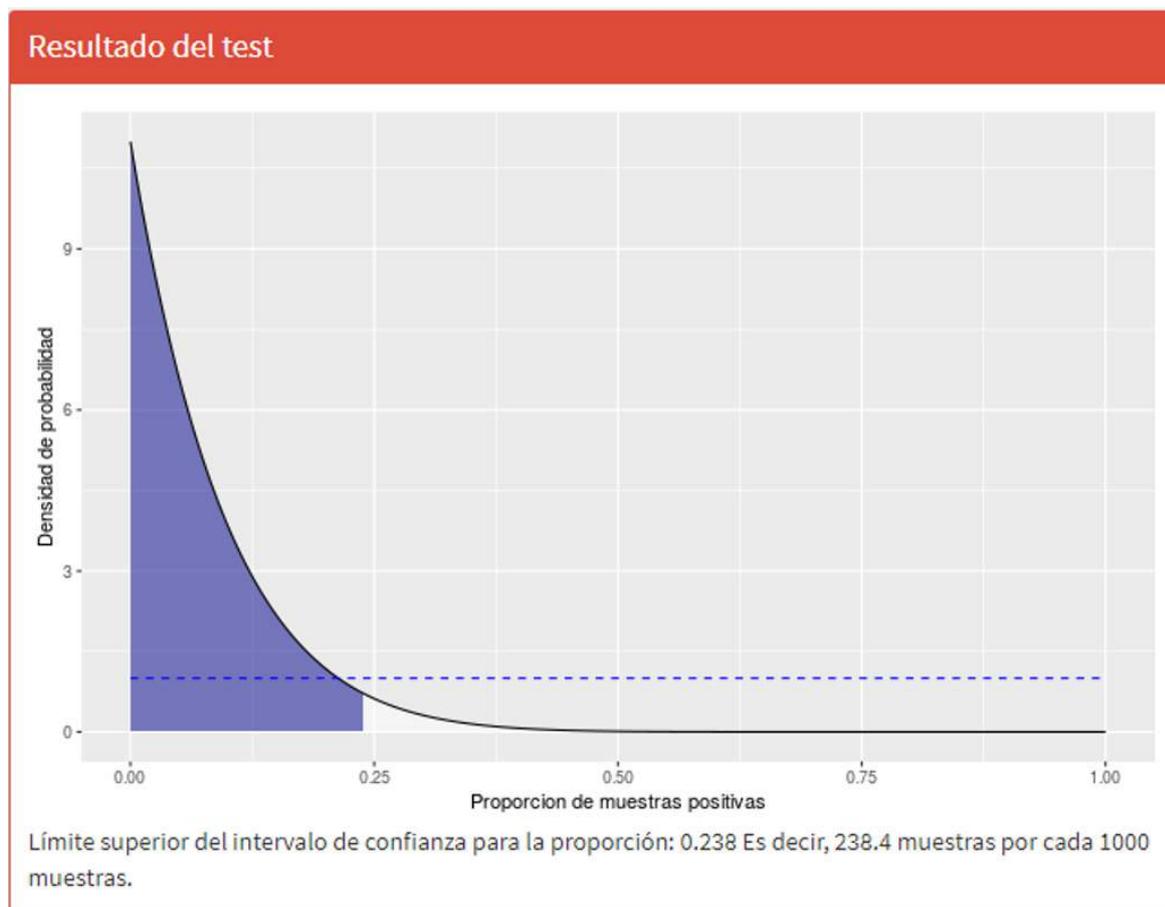
La empresa emplea la herramienta facilitada por la red Bioqura, disponible en el siguiente enlace: <https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>, para el cálculo de la significancia estadística de los resultados microbiológicos obtenidos sobre producto al final de su vida útil.

Resumen de las observaciones

Número de muestras positivas

Número de muestras negativas

Nivel de confianza



Tras introducir el valor del número de muestras en las que se han detectado *L. monocytogenes* en niveles > 100 ufc/g respecto al total de muestras analizadas, la herramienta concluye que el límite superior del intervalo de confianza para la proporción es de 0.238, es decir, que por cada 1000 muestras analizadas, 238.4 muestras estarían contaminadas, con un nivel de confianza de 0.95.

Por ello, la proporción de muestras que podrían estar contaminadas con *L. monocytogenes* se considera inaceptable, al haberse obtenido un límite superior del intervalo de confianza > 0.05. Así, el histórico de datos aportado no puede garantizar, por sí solo, que el producto será inocuo durante toda su vida útil. Es por tanto necesario recurrir a métodos complementarios para validar la vida útil de este producto.

4.2. Ensayo de durabilidad

La empresa presenta los resultados de un ensayo de durabilidad llevado a cabo en un laboratorio de análisis de alimentos. El informe del ensayo de durabilidad presenta las siguientes características:

ESTUDIOS DE DURABILIDAD

Número de informe: 00002X
Descripción completa del alimento:
<ul style="list-style-type: none"> □ Nombre del producto: Queso fresco
<ul style="list-style-type: none"> • Características (pH, a_w, microbiota asociada, etc.): pH 6.77 – 6.80, a_w 0.99 y 0.29 – 0.31 g de NaCl /100 g.
<ul style="list-style-type: none"> □ Vida útil prevista: 9 días
<ul style="list-style-type: none"> □ Identificación de lotes muestreados y fecha de fabricación: se muestrean los lotes 001, 002 y 003, fabricados el 9, 10 y el 11 de octubre de 2019, respectivamente.
<ul style="list-style-type: none"> □ Justificación de las condiciones de conservación (tiempo y T°): la empresa no dispone de información sobre la temperatura y duración de las distintas etapas de almacenamiento y distribución de su producto. Por ello, las muestras se incuban siguiendo los parámetros dados por defecto en la guía técnica para aquellos productos cuya vida útil estimada sea \leq 21 días: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 3 días (1/3 vida útil total estimada) a 7°C. ▪ 3 días (1/3 vida útil total estimada) a 7°C. ▪ 3 días (1/3 vida útil total estimada) a 12°C.
Información relativa al estudio de durabilidad:
<ul style="list-style-type: none"> □ Número de lotes muestreados: De acuerdo a la guía técnica, es necesario muestrear varios lotes del mismo producto, elaborado en condiciones similares para obtener resultados significativos. En este estudio se muestrearon 3 lotes, producidos en días consecutivos: lote 001, lote 002 y lote 003.
<ul style="list-style-type: none"> □ Número de unidades muestreadas por lote: Se tomaron 20 envases por lote.
<ul style="list-style-type: none"> □ Días de muestreo: 9, 10 y 11 de octubre de 2019.
<ul style="list-style-type: none"> □ Fecha de inicio del estudio: 9, 10 y 11 de octubre de 2019.
<ul style="list-style-type: none"> □ Temperatura y tiempo de almacenamiento: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 3 días (1/3 vida útil total estimada) a 7°C. ▪ 3 días (1/3 vida útil total estimada) a 7°C. ▪ 3 días (1/3 vida útil total estimada) a 12°C.
<ul style="list-style-type: none"> □ Método analítico de recuento utilizado: tal y como se establece en el Anexo I del Reglamento (CE) N° 2073/2005, se emplea el método de referencia para el recuento de <i>L. monocytogenes</i> EN ISO 11290-2.
<ul style="list-style-type: none"> □ Límites de recuento: De acuerdo a la guía técnica, para cuantificar de forma precisa el nivel de contaminación de <i>L. monocytogenes</i>, el límite de recuento debe ser de 10 ufc/g. Por ello, el límite de recuento empleado en este estudio es de 10 ufc/g.
<ul style="list-style-type: none"> □ Proporción estimada de unidades > 100 ufc/g e intervalo de confianza asociado: De acuerdo a la guía técnica, la proporción estimada de unidades que superan 100 ufc/g (p) se calcula mediante la siguiente fórmula: $p = r / n$, donde (r) es el n° de muestras con recuentos > 100 ufc/g y (n) es el n° de unidades muestreadas. En nuestro estudio ninguna muestra superaba las 100 ufc/g, por lo que la proporción estimada de unidades que superan los 100 ufc/g (p) es de 0 (0%). Según la guía técnica, para calcular el intervalo de confianza asociado se pueden emplear varias herramientas disponibles en la web, como por ejemplo, Causas Cientia. Tras emplear la citada herramienta se obtiene un intervalo de confianza al 95% de 0% - 4.79 %.
<ul style="list-style-type: none"> □ Conclusiones: <ol style="list-style-type: none"> (1) El estudio se considera adecuado para justificar que <i>L. monocytogenes</i> no excederá los 100 ufc/g durante la vida útil estimada. Por lo que la vida útil estimada de 9 días se considera adecuada para el producto objeto de estudio. (2) Para conseguir un número mayor de unidades analizadas, y así poder obtener un intervalo de confianza más estrecho, se irán recopilando los resultados obtenidos de pruebas repetidas sobre el queso fresco objeto de este estudio, como por ejemplo, los obtenidos durante la verificación del sistema de autocontrol.

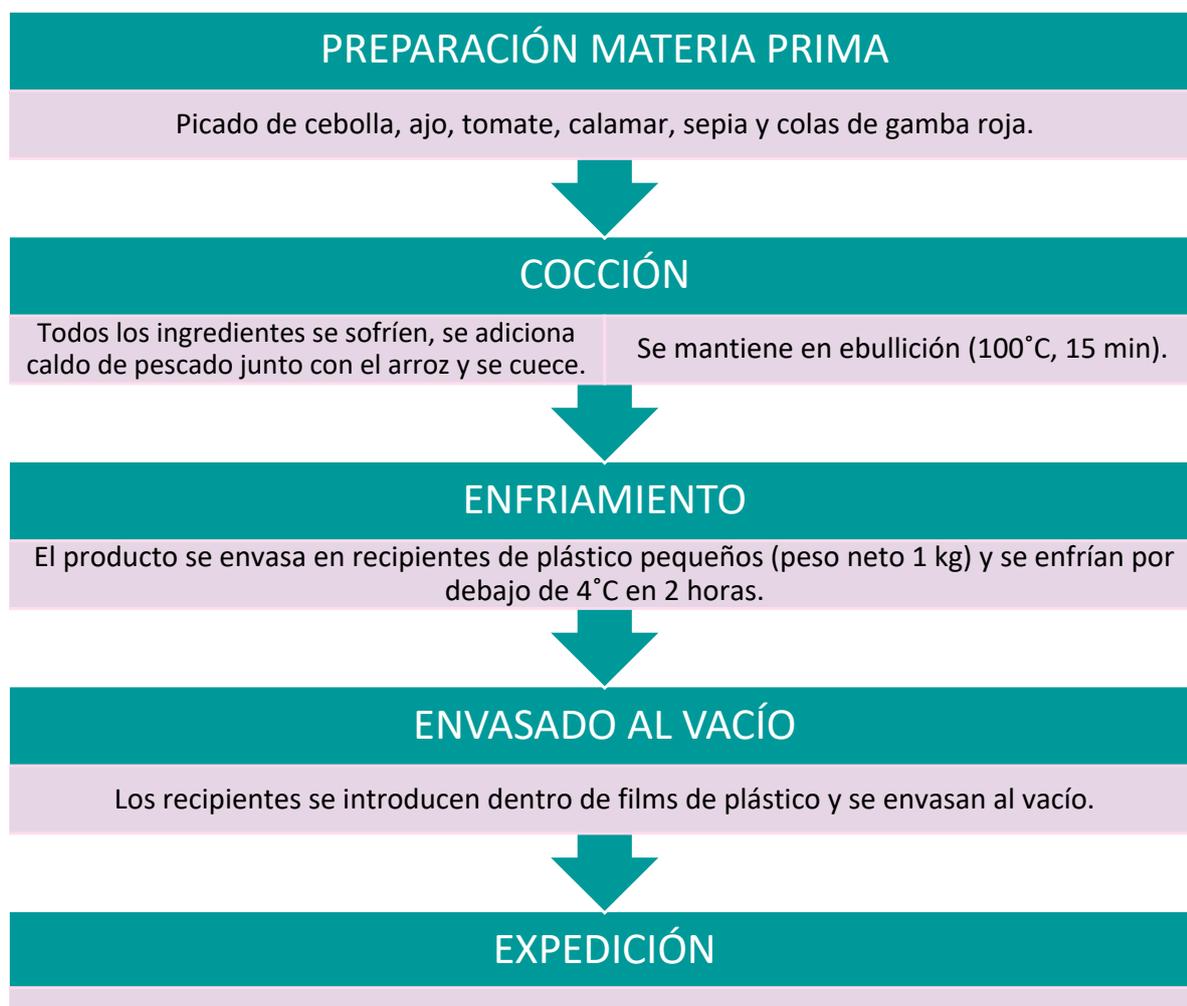
CASO PRÁCTICO: ARRÒS DEL SENYORET

Información general del producto:

Se trata de una paella de pescado y marisco lista para el consumo. No se le adiciona ningún conservante. El producto se distribuye a establecimientos de venta al por menor ubicados en toda España.

Las principales medidas de control que se aplican durante el proceso y que van a influir en la vida útil del producto son: cocción, enfriamiento y el envasado al vacío.

A continuación se representa un diagrama que representa el flujo de dichas operaciones:



ETAPA 1: DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y PROCESO

NOMBRE DEL PRODUCTO: ARRÒS DEL SENYORET

Nº Rev.: 1

Fecha última revisión: 30-07-19

- **INGREDIENTES:** arroz, caldo de pescado (agua, cebolla, apio, tomate, ajo, aceite de oliva, cabeza de rape (32%), zanahoria, puerro, raspa de bacalao (2%), hinojo y sal marina), calamar, sepia, gamba roja, tomate, aceite de oliva, cebolla, sal, ajo, pimentón dulce y azafrán.
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** color olor y sabor propios de la preparación culinaria.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** pH 6.8 y a_w 0.98.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** cocción (ebullición), enfriamiento en abatidor, envasado al vacío y expedición.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** No dispone.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** *L. monocytogenes*.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** *C. botulinum* no proteolítico.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** Envasado en recipientes de plástico negro y recubierto de film transparente. Envasado al vacío. Se comercializa en formato de 4 raciones (1kg). Embalado en cajas de cartón.
- **ETIQUETADO:** Según Reglamento (CE) No 1169/2011.
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** Protegido de la luz solar. Mantener a 0 - 4°C.
- **CONDICIONES DE USO Y MANTENIMIENTO:** Alimento listo para el consumo. Abrir, calentar al gusto en microondas o volcando su contenido en una sartén y consumir. Una vez abierto consumir en menos de 24 horas manteniéndolo en refrigeración.
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general, excepto alérgicos al pescado, moluscos, crustáceos y apio.

ETAPA 2: IDENTIFICAR LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

Se trata de un alimento listo para el consumo cuyas características físico-químicas (pH 6.8 y a_w 0.98) permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*. Así mismo, a pesar de que existe una etapa listericida en el proceso (cocción a 100°C durante 15 minutos) la empresa considera que puede existir riesgo de recontaminación tras el tratamiento térmico, concretamente durante la etapa de envasado y enfriamiento, debido al histórico de datos de muestreo en superficies recopilado durante 2017-2019. Además, al tratarse de un microorganismo anaerobio facultativo, puede crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Por todo ello, se considera que este patógeno puede ser una causa probable de pérdida de seguridad del producto.

Del mismo modo, el producto también podría sufrir cambios organolépticos durante su vida útil que conllevaran a la pérdida de seguridad del mismo. Por ello, las alteraciones organolépticas podrían actuar como factor limitante de la vida útil del producto.

C. botulinum es un patógeno relevante en los alimentos envasados al vacío. Sin embargo, el tratamiento térmico aplicado a este producto garantiza la destrucción tanto de las formas vegetativas como de las formas esporuladas de este microorganismo (se destruyen después de 90 °C durante 10 minutos). Además, el riesgo de contaminación con cepas no proteolíticas de *C. botulinum* se considera muy bajo, por lo que este peligro no se considera causa probable de pérdida de seguridad del producto durante su vida útil.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O FECHA DE CONSUMO PREFERENTE

Una vez identificada la causa probable de pérdida de seguridad del producto, es necesario determinar cómo va a marcarse la vida útil: fecha de caducidad o fecha de consumo preferente. Para ello, se podrá recurrir al árbol de decisiones establecido en la figura 7 de la guía.

PASO 1: *¿Es un producto estable a T^a ambiente?* No, requiere refrigeración para su comercialización.

PASO 2: *¿Es un producto congelado?* No, el producto debe almacenarse y distribuirse a 0 - 4°C.

PASO 3: *¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de Listeria monocytogenes, dando lugar a un alimento nocivo?* Sí, las características físico-químicas del producto (pH 6.8 y a_w 0.98) permiten su crecimiento, tal y como establece la nota 8, del Anexo I, Capítulo 1, del Reglamento (CE) No 2073/2005, de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Por ello, procede marcar la vida útil de este producto como fecha de caducidad.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL: HERRAMIENTAS.

El operador alimentario ha estado comercializando este producto durante varios años con una vida útil prevista de 18 días, por lo que emplea el histórico de datos para validar la vida útil de su producto.

4.1. Histórico de datos

La empresa presenta el siguiente histórico de datos obtenido en los últimos 3 años. Las muestras tomadas sobre producto corresponden a muestras tomadas al final de la vida útil estimada en base a un estudio sensorial realizado por la empresa: 18 días desde su fabricación.

Las muestras de superficies se han tomado siguiendo las recomendaciones del documento técnico *GUIDELINES ON SAMPLING THE FOOD PROCESSING AREA AND EQUIPMENT FOR THE DETECTION OF Listeria monocytogenes*, Anses Versión 3 – 20/08/2012.

Año	Investigación <i>L. monocytogenes</i> en producto		
	Nº ejemplares analizados	Nº muestras conformes (ausencia/25g)	Nº muestras no conformes (presencia/25g)
2017	31	31	0
2018	31	30	1 (10 ufc/g)
2019	31	31	0
TOTAL	93	92	1

Año	Investigación <i>L. monocytogenes</i> en superficies		
	Nº superficies analizadas	Nº muestras conformes (ausencia/100 cm ²)	Nº muestras no conformes (presencia/100 cm ²)
2017	4	3	1 (rejilla abatidor)
2018	4	3	1 (desagüe)
2019	4	4	0
TOTAL	12	10	2

La empresa emplea la herramienta facilitada por la red Bioqura, disponible en el siguiente enlace: <https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/>, para el cálculo de la significancia estadística de los resultados microbiológicos obtenidos sobre producto.

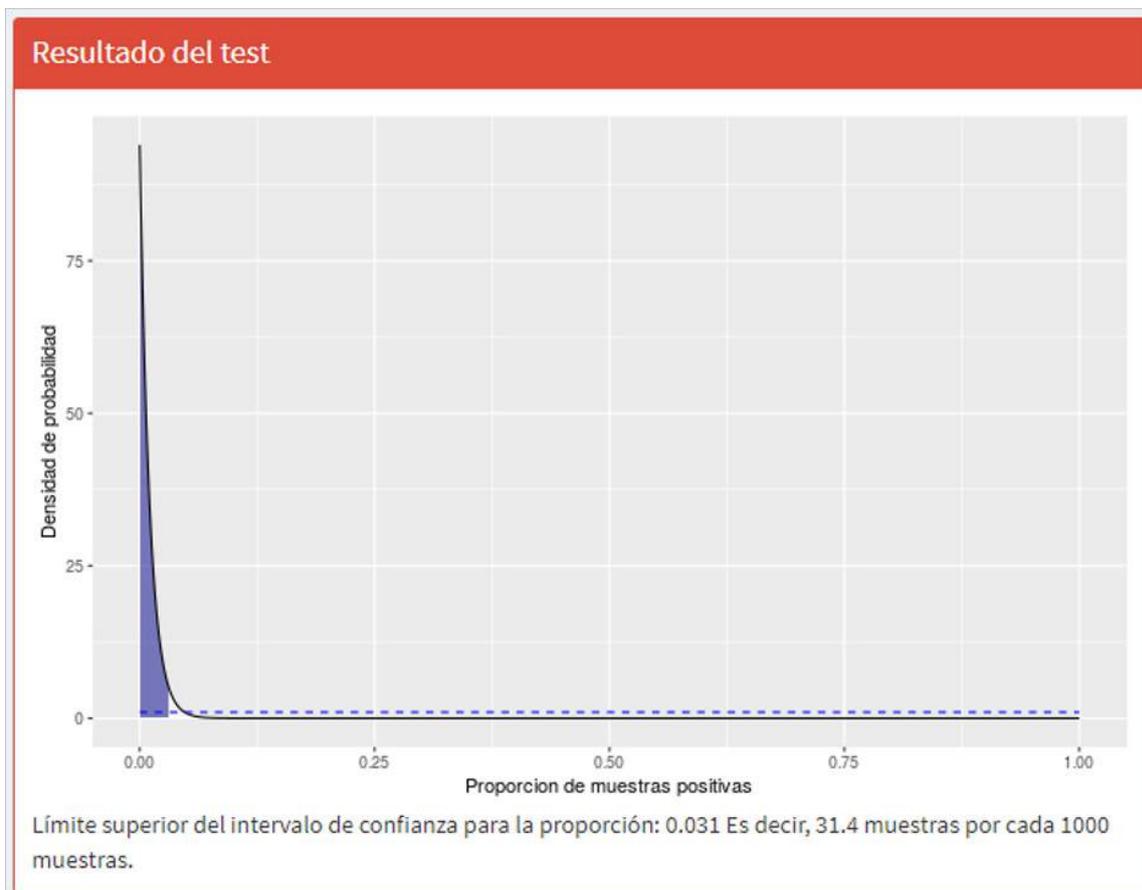
A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Resumen de las observaciones

Número de muestras positivas

Número de muestras negativas

Nivel de confianza



Tras introducir el valor del número de muestras en las que se han detectado niveles de *L. monocytogenes* > 100ufc/g respecto al total de muestras analizadas (0 muestras), la herramienta concluye que el límite superior del intervalo de confianza para la proporción es de 0.031, es decir, que por cada 1000 muestras analizadas, 31.4 muestras estarían contaminadas, con un nivel de confianza de 0.95.

Al encontrarse por debajo de 0.05 el límite superior del intervalo de confianza se considera aceptable la proporción de muestras que podrían estar contaminadas con *L. monocytogenes*. Por ello, el histórico de datos aportado se considera una herramienta adecuada para validar la vida útil establecida por la empresa para dicho producto (18 días).

No obstante, para conseguir un número mayor de unidades analizadas, y así poder obtener un intervalo de confianza más estrecho, se irán recopilando los resultados obtenidos de pruebas repetidas sobre el "arròs del senyoret", como por ejemplo, los obtenidos durante la verificación del sistema de autocontrol.

CASO PRÁCTICO FILETES DE LOMO DE CERDO

ETAPA 1: DESCRIPCIÓN DE LOS PRODUCTOS Y PROCESOS

NOMBRE DEL PRODUCTO: FILETES DE LOMO DE CERDO

Nº Rev.: 1

Fecha última revisión: 7-7-19

- **INGREDIENTES:** lomo de cerdo.
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** olor, color y sabor propios del producto.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** pH 5.4 - 5.8 y a_w 0.98 -0.99.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** corte en máquina fileteadora, envasado en atmósfera modificada, al vacío y atmósfera normal.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** no hay legalmente establecidos.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** no hay legalmente establecidos.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** *C. botulinum* no proteolítico en envasados al vacío o en atmósfera modificada.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** Envasado en barquetas de polietileno (PE) y poliamida (PA), con láminas de PE_PP en atmósfera modificada (70% O₂ + 30% CO₂). Bolsas de PE-PA de vacío. Barquetas de poliestireno expandido y lámina de PE en atmósfera normal. Varios formatos de peso a demanda del cliente.
- **ETIQUETADO:** indicaciones obligatorias según Reglamento (UE) N° 1169/2011 y marca de identificación según Reglamento (CE) N° 853/2004
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** mantener entre 0 - 5°C.
- **CONDICIONES DE USO:** las habituales para este producto de cocinar antes del consumo. No se considera necesario especificar en el etiquetado
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general.

ETAPA 2: IDENTIFICACIÓN DE LAS CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

En las carnes frescas puede darse el desarrollo tanto de microorganismo patógenos como alterantes psicótropos.

A) Carnes envasadas en condiciones atmósfera normal

En el caso de carnes envasadas en presencia de atmósfera normal, el factor limitante de su vida útil son las alteraciones organolépticas causadas por el crecimiento de bacterias alterantes, siendo el principal grupo las *Pseudomonas* spp. Estas alteraciones consisten fundamentalmente en el desarrollo de olores y sabores y la formación de limo superficial y darán lugar a características propias de

la putrefacción. Por lo tanto, estas alteraciones pueden dar lugar a la puesta en el mercado de productos no seguros por deterioro, descomposición o putrefacción si no se establece la vida útil adecuadamente.

B) Carnes envasadas en atmósferas modificadas (70% O₂ + 30% CO₂)

En el caso de carnes envasadas en presencia atmósfera modificada, el factor limitante de su vida útil son las alteraciones organolépticas causadas por el crecimiento de bacterias alterantes, siendo las bacterias ácido lácticas y *Brochothrix thermosphacta* las más relevantes. Las alteraciones organolépticas producidas son diferentes de manera que, los olores son menos intensos y de diferentes características a los que se producen en condiciones de envasado en atmósfera normal.

c) Carnes envasadas al vacío

En lo referente al deterioro organoléptico ocasionado por el crecimiento de bacterias alterantes, es aplicable lo mencionado para atmósferas modificadas, es decir que son la bacterias ácido lácticas las principales responsables del deterioro. En las carnes envasadas al vacío se puede considerar la producción de toxina producida por *C. botulinum* no proteolítico como posible causa de la pérdida de seguridad del producto. Este germen no crece por debajo de los 3.3 °C sin embargo, la temperatura de almacenamiento durante la vida útil del producto hace más que probable que se supere esta temperatura. La toxina producida es relativamente termorresistente por lo que el tratamiento térmico de cocinado de la carne no es una medida de control que permita garantizar su seguridad.

d) Todos los tipos de envasado

Yersinia enterocolítica, al tratarse de un microorganismo que puede crecer tanto en presencia como de ausencia de oxígeno podría ser relevante en cualquier tipo de envasado. Este microorganismo no tiene criterio de seguridad alimentaria incluido en el Reglamento (CE) N° 2073/2005. Está asociada principalmente a la carne de cerdo al ser esta especie su mayor reservorio, en especial los despojos, que se contaminan a partir de tonsilas y lenguas durante el procesado de la canal. La capacidad de competir con un número alto de bacterias psicotróficas normalmente presentes en carnes con un pH normal parece ser pobre especialmente a bajas temperaturas. A temperaturas más altas (> 5°C) y carne con pH alto sí se puede multiplicar considerablemente.

Los estudios epidemiológicos, muestran una importante relación entre el consumo de carne de cerdo cruda, no cocinada completamente o manipulada incorrectamente dando lugar a contaminaciones cruzadas.

La literatura consultada no indica que la vida útil sea un factor determinante para reducir la incidencia de toxiinfecciones causadas por *Y. enterocolitica* y por lo tanto no se ha considerado relevante para establecer la vida útil (NACMCF, 2004).

Tipo envasado	Causas probables de pérdida de seguridad
Atmósfera normal	<ul style="list-style-type: none"> Microorganismos alterantes psicrófilos (<i>Pseudomonas</i>).
Atmósfera modificada	<ul style="list-style-type: none"> Microorganismos alterantes psicrófilos (bacterias ácido lácticas y <i>Brochothrix thermosphacta</i>).
Al vacío	<ul style="list-style-type: none"> Microorganismos alterantes psicrófilos (bacterias ácido lácticas). <i>Clostridium botulinum</i> no proteolítico.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O CONSUMO PREFERENTE

Una vez identificada la causa probable de pérdida de seguridad del producto, es necesario determinar cómo va a marcarse la vida útil: fecha de caducidad o fecha de consumo preferente. Para ello, se podrá recurrir al árbol de decisiones establecido en la figura 7 de la guía.

PASO 1: *¿Es un producto estable a Tª ambiente? No, requiere refrigeración para su comercialización.*

PASO 2: *¿Es un producto congelado? No.*

PASO 3: *¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* dando lugar a un alimento nocivo? No.*

PASO 4: *¿Puede permitir la formación de histamina o el crecimiento de *C. botulinum* no proteolítico hasta niveles inaceptables, dando lugar a un alimento nocivo?*

Sí, en el caso del producto envasado al vacío podría crecer *C. botulinum*, por lo tanto el marcado de fechas se indicará con fecha de caducidad.

No, en el caso de atmósfera normal y modificada (70% O₂ + 30% CO₂).

PASO 5: *¿Puede deteriorarse química, física o microbiológicamente el alimento, dando lugar, a corto plazo, a un producto no apto para el consumo (deteriorado, putrefacto o descompuesto)? Sí en el caso de carnes envasadas en atmósfera normal.*

En el caso del producto envasado en atmósfera modificada las alteraciones sensoriales se dan de manera más lenta y con menor intensidad debido al crecimiento de bacterias ácido lácticas. A pesar de ser las alteraciones más lentas y menos intensas que en atmósfera normal, se ha considerado que velocidad de aparición en estos productos hace razonable indicar fecha de caducidad.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE VIDA ÚTIL

La empresa aporta un estudio de vida útil basado en microbiología predictiva y análisis sensorial en carnes envasadas al vacío.

En el estudio presentado no ha considerado el tiempo de almacenamiento en planta de producción al ser menor de 1 día y encontrarse a temperaturas inferiores

a las de almacenamiento en minoristas. En relación a la temperatura de exposición en minoristas, la empresa ha comprobado que es siempre $< 5^{\circ}\text{C}$ y el tiempo medio de exposición independientemente del tipo de envasado es de un máximo de 4 días.

Se ha estimado una temperatura de 7°C para la etapa de almacenamiento por el consumidor en base a la Opinión de EFSA adoptada en diciembre de 2017, en la que aporta datos de temperaturas medias en frigoríficos domésticos en España obtenidos de literatura científica de 6.98°C .

La empresa presenta un histórico de datos de psicótrofos totales en el que han obtenido unos valores medios de 2.5 ufc/g .

A) Carnes envasadas al vacío

La empresa ha establecido una vida útil de 18 días basada en datos de la literatura científica (Peck, 2019).

Debido a que cabe la posibilidad de que el producto pueda estar alterado sensorialmente a los 18 días, se confirmará la validez de los 18 días mediante la microbiología predictiva y un análisis sensorial.

B) Producto envasado en atmósfera normal y modificada

En las carnes envasadas en atmósfera normal y modificada es el deterioro organoléptico la causa que hará que los productos sean no seguros y limiten su vida útil por deterioro que los haga inaceptables para el consumo.

Al existir un modelo de microbiología predictiva disponible para estos productos, se decidió aplicar en un primer paso el modelo predictivo antes de proceder con la evaluación sensorial.

Se ha considerado establecer la vida útil basándose en un análisis sensorial. Con el fin de complementar el estudio, se realizarán 3 analíticas de producto en cada tipo de envasado en los que realizarán recuentos totales de aerobios mesófilos como indicadores de alteración.

Microbiología predictiva

Hay un modelo específico que puede emplearse para establecer la fecha de caducidad por deterioro sensorial: predictivos *Predictive Models for Meat* del Danish Meat Research Institute, <http://dmripredict.dk/>

Aunque la temperatura prevista de almacenamiento en comercio minorista es menor de 7°C , se seleccionó esta temperatura para el tiempo total de almacenamiento de manera que los resultados sean más restrictivos.

Como carga inicial de psicótopos totales se tuvieron en cuenta los valores medios obtenidos en el histórico de datos de la empresa: 2.5 ufc/g.

Shelf life of fresh pork cuts

Vacuum packed and/or MAP-packed (70% O₂ + 30% CO₂) and/or stored under aerobic conditions (on "Christmas trees" (multiple hooks), in boxes, wrapped, etc.). Version 5.1

Input

Psychrotrophic count (6.5 °C for 10 days) at packaging:

Average

Standard deviation (std) log cfu/cm²

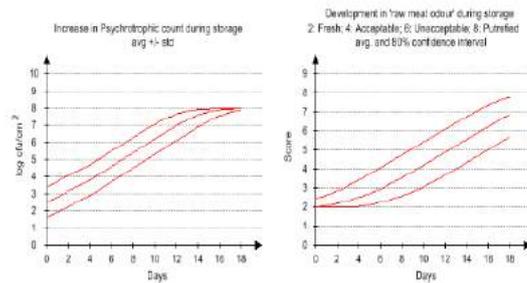
1. Temperature °C in days

2. Temperature °C in days

3. Temperature °C in days

4. Temperature °C in days

Results



Calculate days until a given raw meat odour

Valid for the current conditions

Raw meat odour - average

Days

112

Shelf life of fresh pork cuts

Vacuum packed and/or MAP-packed (70% O₂ + 30% CO₂) and/or stored under aerobic conditions (on "Christmas trees" (multiple hooks), in boxes, wrapped, etc.). Version 5.1

Input

Psychrotrophic count (6.5 °C for 10 days) at packaging:

Average

Standard deviation (std) log cfu/cm²

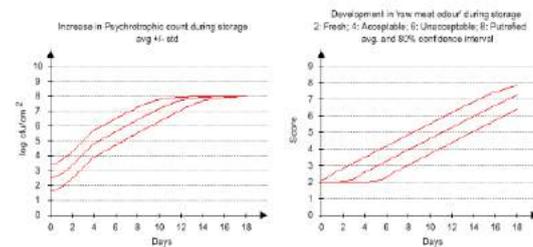
1. Temperature °C in days

2. Temperature °C in days

3. Temperature °C in days

4. Temperature °C in days

Results



Calculate days until a given raw meat odour

Valid for the current conditions

Raw meat odour - average

Days

Shelf life of fresh pork cuts

Vacuum packed and/or MAP-packed (70% O₂ + 30% CO₂) and/or stored under aerobic conditions (on "Christmas trees" (multiple hooks), in boxes, wrapped, etc.) Version 5.1

Input

Psychrotrophic count (6.5 °C for 10 days) at packaging:

Average

Standard deviation (std) log cfu/cm²

1. Temperature °C in days

2. Temperature °C in days

3. Temperature °C in days

4. Temperature °C in days

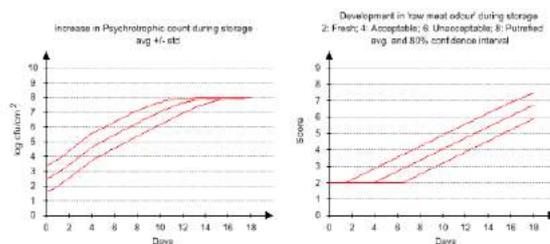
Calculate days until a given raw meat odour

Valid for the current conditions

Raw meat odour - average

Days

Results



Los resultados son:

- envasado al vacío: 12 días
- envasado en atmósfera normal: 11 días
- envasado en atmósfera modificada: 13 días

Análisis sensorial

Se formó un equipo de 4 personas para la evaluación sensorial del producto. En cada muestra se evaluaron olor y color, valorándose ambos ente el 1 y el 5, correspondiendo el 1 a excelente, 2 muy bueno, 3 bueno, 4 aceptable y 5 inaceptable.

La evaluación se llevó a cabo los días:

- 15 días para el envasado al vacío
- 13 días para el envasado en atmósfera normal
- 16 días para el envasado en atmósfera modificada

Todas las muestras presentaron resultados entre bueno y aceptable los días de la evaluación.

Análisis microbiológicos

En el caso de productos envasados en atmósfera normal se pueden utilizar como indicadores de deterioro el recuento de aerobios totales o pseudomonas y los

límites son de 10^7 - $10^{7.5}$ ufc/g, sin embargo el deterioro puede darse a niveles de 10^6 ufc/g. En el caso de carnes envasadas al vacío de pH normal debido a que la flora predominante es láctica y las alteraciones que producen son más leves. Los niveles de recuentos que indican el inicio de deterioro sensorial son de 10^8 ufc/g. Otras fuentes establecen niveles de 10^9 ufc/g bacterias ácido lácticas, como valor indicador de alteración.

Se realizaron análisis de tres muestras de cada tipo de envasado. Se conservaron 4 días a 5°C y el resto del tiempo hasta su análisis se mantuvieron a 7°C. El sacrificio de los animales y obtención de las canales fue el día anterior al procesado en el matadero habitual. Estas son las prácticas habituales de trabajo.

Tras el procesado y envasado de la carne, el procedimiento analítico se inició a los:

- 15 días para el envasado al vacío
- 13 días para el envasado en atmósfera normal
- 16 días para el envasado en atmósfera modificada

Ninguna de las muestras sobrepasó los límites recomendados por la bibliografía consultada.

CONCLUSIONES

Tras comprobar mediante análisis sensorial y microbiológico que, tras 13 y 16 días después del procesado, las carnes envasadas en atmósfera normal y modificada no presentan deterioro, se aplicó una reducción de dos días de margen de seguridad para asegurar la caducidad en circunstancias peores a las que se utilizaron en el estudio:

- 11 días para el envasado en atmósfera normal
- 14 días para el envasado en atmósfera modificada

En el caso de carne envasada al vacío se tomó como referencia la recomendación de un máximo de 18 días obtenida de la literatura científica. Sin embargo, se redujo al comprobar los resultados del modelo predictivo a 12 días. Desde el punto de vista sensorial y microbiológico su estado era bueno a los 15 días de su procesado con lo cual al establecer 12 días, se aplica un margen de seguridad adicional.

Observación: todos los registros y documentación de los análisis sensoriales y microbiológicos están disponibles en archivo.

CASO PRÁCTICO ATÚN AHUMADO

Información general del producto:

Es un producto listo para consumo. Se ahúma de manera natural con madera de haya. Se comercializa normalmente loncheado, envasado al vacío en diferentes pesos, pero también en lomos sin lonchear. Las principales etapas del proceso son:



ETAPA 1: DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO Y DEL PROCESO

ATÚN AHUMADO EN TACOS Y LONCHEADO

N° Rev.: 3 Fecha
última revisión: 26-01-20

- **INGREDIENTES:** atún (*Thunnus albacares*), sal, azúcar y humo natural.
- **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PRODUCTO:** olor, color y sabor propios del producto.
- **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PRODUCTO FINAL:** contenido de sal en fase acuosa 6%, contenido en sal 4%, pH 6.0, a_w 0.95, compuestos fenólicos 10 ppm.
- **ESPECIFICACIONES DEL PROCESADO:** Se parte de lomos de atún congelados. Se realiza un ahumado en frío a 25°C con maderas naturales. No hay PCCs, solo Prerrequisitos Operativos (PPRO). según adaptación de la Guía de Prácticas Correctas de Higiene de Productos de la Pesca aplicada (European Salmon Smokers Association. European Guide To Good Practice For Smoked And/Or Salted And/Or Marinated Fish).
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE HIGIENE DE LOS PROCESOS:** no hay legalmente establecidos.
- **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE SEGURIDAD:** Histamina y *L. monocytogenes*.
- **OTROS MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA SEGURIDAD DEL PRODUCTO:** *C. botulinum* no proteolítico.
- **PRESENTACIÓN, ENVASADO Y EMBALAJE:** tacos y loncheado envasado al vacío, varios pesos según demanda del cliente. Envasado en bolsas de PE-PA de vacío.
- **ETIQUETADO:** según normativa de aplicación.
- **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN:** mantener entre 0 - 4°C.
- **CONDICIONES DE USO:** producto listo para su consumo sin que sea necesario ningún tratamiento.
- **POBLACIÓN DESTINO:** Población en general excepto alérgicos al pescado. No recomendado su consumo en embarazadas e inmunodeprimidos siguiendo las recomendaciones de diferentes instituciones.

ETAPA 2: IDENTIFICACIÓN DE CAUSAS PROBABLES DE PÉRDIDA DE SEGURIDAD

Se trata de un alimento listo para el consumo cuyas características físico-químicas (pH 6.0, a_w 0.95) permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*. Además, el pescado ahumado es un producto en el que se ha detectado *L. monocytogenes* con frecuencia y se ha visto implicado en brotes de toxiinfección. Por ello, este patógeno puede ser una causa probable de pérdida de seguridad del producto a lo largo de su vida útil.

Existen diversas bacterias psicotrofas que pueden producir histamina en condiciones de refrigeración. Entre ellas, las más relevantes según la bibliografía son *Morganella psychotolerans*, *Photobacterium phosphoreum* y *Pseudomonas fluorescens*. De entre ellas, es *Morganella psychotolerans* la que desempeña un papel más importante en la formación de histamina en condiciones de refrigeración (Emborg, Jette. 2007; Kim, y col. 2006). Estas bacterias pueden dar lugar a niveles inaceptables de histamina durante la vida útil del producto si se dan las condiciones adecuadas. Por ello, la formación de histamina puede ser también una causa probable de pérdida de seguridad del producto durante su vida útil.

Las cepas no proteolíticas de *C. botulinum* pueden crecer en refrigeración y en productos envasados al vacío o en atmósferas modificadas con baja concentración de O_2 . Sin embargo, se ha demostrado que la concentración de sal en fase acuosa de este producto (6%) inhibe su crecimiento, por lo que este patógeno no se considera causa probable de pérdida de seguridad de este producto.

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DE FECHA DE CADUCIDAD O CONSUMO PREFERENTE

Una vez identificadas las causas probables de pérdida de seguridad del producto, es necesario determinar cómo va a marcarse la vida útil: fecha de caducidad o fecha de consumo preferente. Para ello, se podrá recurrir al árbol de decisiones establecido en la figura 7 de la guía.

PASO 1: ¿Es un producto estable a T^a ambiente? No, requiere refrigeración para su comercialización.

PASO 2: ¿Es un producto congelado? No, el producto debe almacenarse y distribuirse entre 0 y 4°C.

PASO 3: ¿Es un alimento listo para el consumo que puede permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, dando lugar a un alimento nocivo? Sí, las características físico-químicas del producto (pH 6 y a_w 0.95) podrían permitir su crecimiento, tal y como establece el Reglamento (CE) N° 2073/2005.

Por ello, procede marcar la vida útil de este producto como fecha de caducidad.

ETAPA 4: VALIDACIÓN DE LA VIDA ÚTIL

Se realizará el estudio únicamente sobre producto loncheado al considerarse el peor caso posible en comparación con el producto en tacos debido a la mayor posibilidad de contaminación del producto.

La empresa aporta un histórico de datos, estudios de microbiología predictiva y análisis sensorial.

4.1. Histórico de datos

La empresa presenta un histórico de datos compuesto por 5 análisis de superficies realizados durante la elaboración del producto. No se detectó presencia de *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras. Para el muestreo de superficies se siguieron las directrices establecidas en el documento "Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes*" Versión 3 – 20/08/2012, tal y como se recomienda en la página web de la Comisión Europea (https://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/food_hygiene/microbiological_criteria_en).

Por otro lado, la empresa aporta también un histórico de datos obtenido durante el último año en el que ha hecho investigación de *L. monocytogenes*, y contenido de histamina en producto final.

Nº muestra	Investigación de <i>L. monocytogenes</i>	Contenido de histamina (ppm)
1	No detectado en 25g	20
2	No detectado en 25g	0
3	No detectado en 25g	5
4	No detectado en 25g	4
5	No detectado en 25g	7
6	No detectado en 25g	15
7	No detectado en 25g	10
8	No detectado en 25g	10
9	No detectado en 25g	20
10	No detectado en 25g	5
11	No detectado en 25g	5
12	No detectado en 25g	6

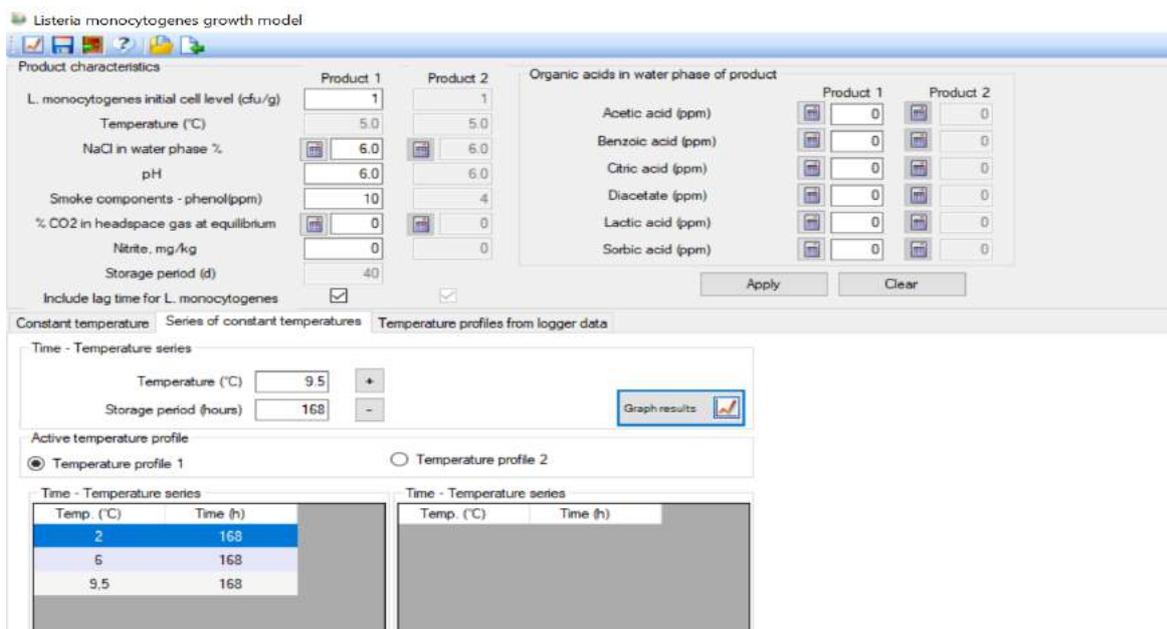
4.2. Microbiología predictiva

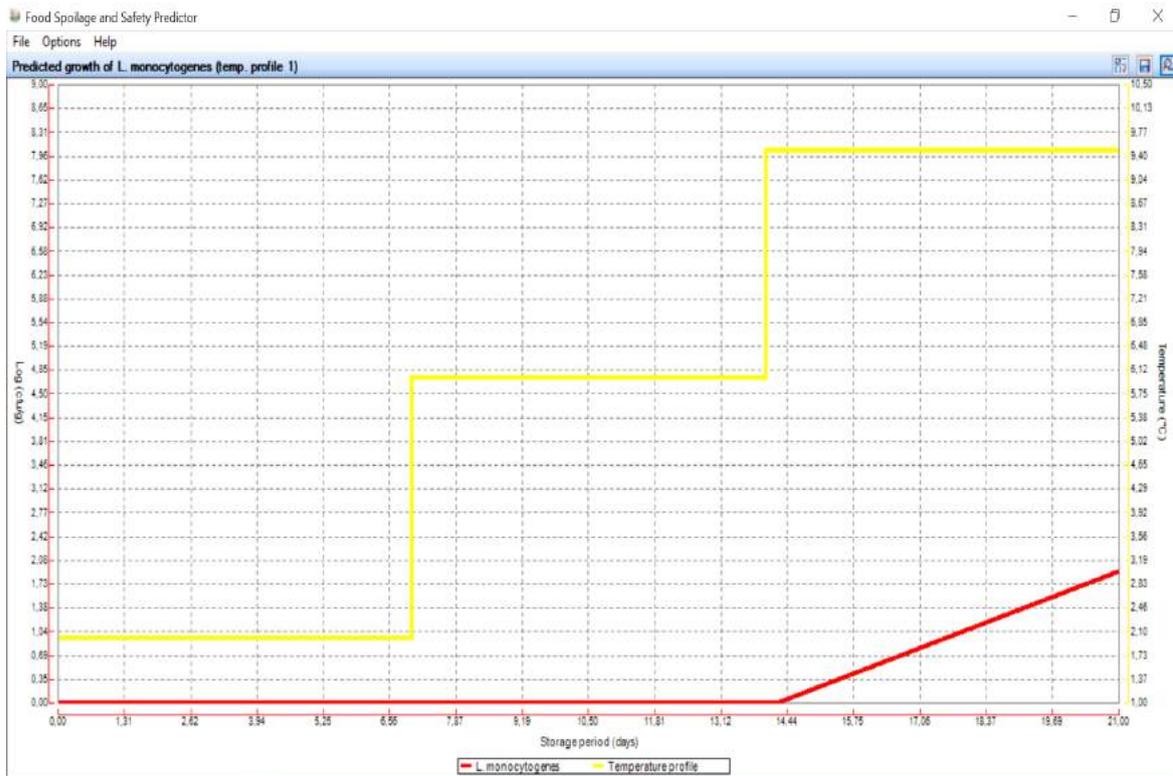
Se ha utilizado el programa Food Spoilage and Safety Predictor, FSSP (<http://fssp.food.dtu.dk/>). Teniendo en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso, la empresa aporta la siguiente información para tener en cuenta durante el estudio:

- 7 días en almacenamiento en la empresa a una temperatura de 2°C
- 7 días en almacenamiento en minoristas y distribuidores intermediarios a 6 °C
- 7 días en almacenamiento en frigoríficos domésticos 8 °C

Estas condiciones se han estimado como las más probables en base a una vida útil esperada de 21 días. Su elección se ha basado en datos propios obtenidos durante el almacenamiento del producto en la propia empresa y en los minoristas a los que se distribuye. Los valores referentes al almacenamiento en frigorífico doméstico se han obtenido de bibliografía científica (Jofré y col., 2019).

Para estimar el crecimiento de *L. monocytogenes* se consideró una contaminación inicial de 1 ufc/g, teniendo en cuenta los valores obtenidos en el histórico de datos que fueron, en todas las muestras analizadas, de "no detectado en 25g", de manera que se ha considerado un carga inicial mucho mayor a la de los resultados obtenidos en la empresa. Además, la empresa dispone de los datos de materia prima aportados por los proveedores, con resultados de "no detectado en 25g". La concentración de componentes fenólicos en este producto es de 10 ppm. Se seleccionó la opción de incluir la fase de adaptación o latencia (lag time) ya que según las recomendaciones de modo de uso del programa es más realista.

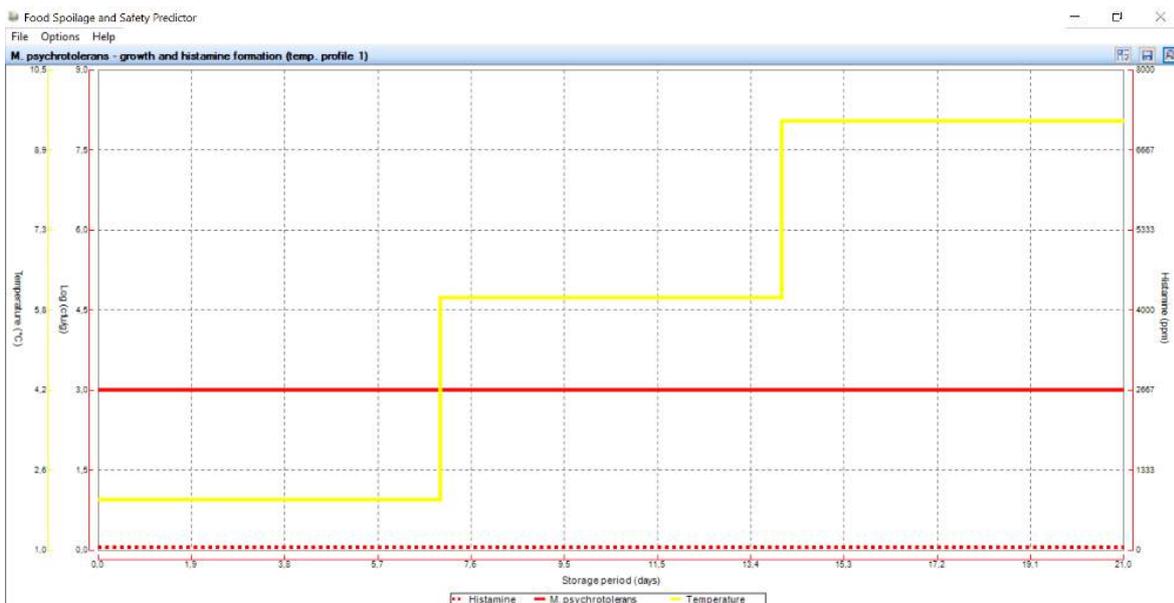
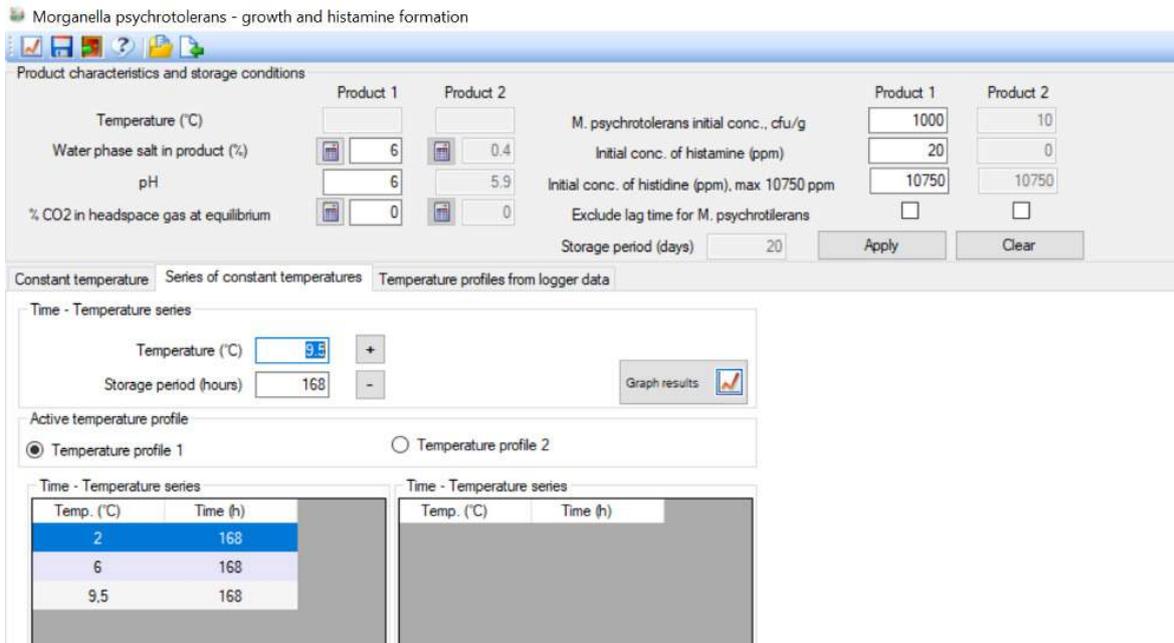




120

Según la estimación del FSSP a los 21 días, tiempo estimado de vida útil, *Listeria monocytogenes* no ha alcanzado la concentración de 2 log (100 ufc/g).

Se utilizó el mismo programa de microbiología predictiva y en particular el modelo para estimar la formación de histamina por *Morganella psychotolerans*. La concentración inicial de *M. psychotolerans* se estimó en base a los resultados de la bibliografía científica consultada según la cual, en la especie *Tunnus albacares* fresco, la concentración de gérmenes productores de histamina es generalmente baja (Gonzalo García-Tapia y col., 2013; Kim y col., 2006). Se ha tomado como referencia el valor de 1000 ufc/g usado por EFSA en su informe "Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level". Para el contenido en histidina se utilizó el valor máximo que permite el modelo, 10750 ppm, siguiendo el mismo criterio usado por EFSA en el informe mencionado. El contenido en histamina se consideró a partir de los resultados obtenidos en el histórico de datos, empleando el escenario más desfavorable (20 ppm).



El modelo no predice ni crecimiento de *Morganella psychrotolerans* ni formación de histamina durante 21 días.

De los datos obtenidos se deduce que el factor limitante de la vida útil por motivos de inocuidad es el crecimiento de *L. monocytogenes*.

4.3. Análisis sensorial

Adicionalmente la empresa ha realizado un análisis sensorial del producto al final de su vida útil.

En dicha evaluación participaron personal del laboratorio y dos miembros de la industria elaboradora. En ningún caso se detectaron alteraciones que hicieran el producto no seguro por no ser apto para el consumo según el Reglamento (CE) N° 178/2002. En cuanto a la calidad organoléptica se consideró adecuada desde el punto de vista comercial.

CONCLUSIONES

Se procede a dar una vida útil de 21 días. No se ha considerado aplicar un margen de seguridad adicional a los resultados al considerarse que las condiciones en que se realizaron los estudios son las más desfavorables.

Se realizarán analíticas periódicas al menos una vez al año y siguiendo las mismas pautas de almacenamiento. De esta manera se cumplirán los requerimientos del Reglamento N° 2073/2005 en cuanto a criterios de seguridad y se aumentará la fiabilidad del histórico de datos a la vez que se verifica tanto la vida útil asignada como los prerrequisitos y APPCC implantado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. 1992. Report on Vacuum Packaging and Associated Processes.
- Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. 2020. Subgroup on non-proteolytic *Clostridium botulinum* and vacuum and modified atmosphere packaged foods. Final report. https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/acmsf-vpmap-subgroup-report_1.pdf
- AESAN, 2011. Revista del comité científico nº 14. 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.
- Agence nationales de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail. Janvier, September, Decembre 2011, Février, Avril 2012.
- Anna Jofré, Mari Luz Latorre-Moratalla, Margarita Garriga, Sara Bover-Cid. 2019 Domestic refrigerator temperatures in Spain: Assessment of its impact on the safety and shelf-life of cooked meat products. *Food Research International* 126:108578.
- ANSES. French agency for food, environmental and occupational health & safety. 2010. *Clostridium botulinum* and neurotoxigenic *Clostridia*. Data sheet on foodborne microbial hazards. (<https://www.anses.fr/en/system/files/MIC2010sa0234FiEN.pdf>).
- ANSES. French agency for food, environmental and occupational health & safety. 2011. Characteristics et sources of *Bacillus cereus*. Data sheet on foodborne hazards. (<https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0116Fi.pdf>).
- ANSES. French agency for food, environmental and occupational health & safety. 2011. Characteristics et sources of *Listeria monocytogenes*. Data sheet on foodborne hazards. (<https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0171FiEN.pdf>).
- ANSES. French agency for food, environmental and occupational health & safety. 2012. Characteristics et sources of Histamine. Data sheet on foodborne hazards. (<https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2012sa0209Fi.pdf>).
- ANSES. French agency for food, environmental and occupational health & safety. 2012. Nature and sources of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Main microbiological characteristics. Data sheet on foodborne hazards. (<https://www.anses.fr/en/system/files/MIC2011sa0262FiEN.pdf>).
- Artin, I., Carter, A.T., Holst, E., Lovenklev, M., Mason, D.R. y col. (2008). Effects of carbon dioxide on neurotoxin gene expression non proteolytic *Clostridium botulinum* Type E. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 2391 – 2397.
- Bari, M.L., Hossain, M.A., Isshiki, K. and Ukuku, D. 2011. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. *Journal of Pathogen*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335665/>

- C. M. Dominic Man (Editor), 2015, Shelf Life, Second edition, Wiley Blackwell.
- C.M.D. Man (editor) 1994, Shelf Life Evaluation of Foods, Springer-Science+Business Media, B.V.
- Cardinala, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjoernevik, M., Ouissed, A., Valleta, J.L. and Leroia, F. 2004. Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International* 37(2): 181-193.
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M. and Zurera, G. 2007. Survey of Temperature and Consumption Patterns of Fresh-Cut Leafy Green Salads: Risk Factors for Listeriosis. *Journal of Food Protection*, Vol. 70, No. 10, 2407–2412.
- Casajuana Filella, N. 1987. Algunas reflexiones sobre índices de calidad en productos marinos congelados. *Arxius de l'Esc. Sup. D'Agricultura*. Barcelona 10: 17-34.
- Catherine W. Donnelly, Martin Mitchell. 2009. Refrigerated Foods Association (RFA) Standardized Protocol for Determining the Shelf Life of Refrigerated Ready-To-Eat (RTE) Foods.
- Cathy Stannard. 1997. Development and use of microbiological criteria for foods, Guidance for those involved in using and interpreting microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today* 11 (3).
- Codex Alimentarius. 1995. Principios y directrices para el intercambio de información en situaciones de emergencia relacionadas con la inocuidad de los alimentos (CAC/GL 19-1995). Revisión 2016.
- Comisión Europea. 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.
- Couesnon, A., Raffestin, S. y Popoff, M.R. 2006. Expression of botulinum neurotoxins A and associated non-toxin genes, during the transcription phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR. *Microbiology*, 152: 759 – 770.
- Davidson, C.M. Dowdell, M.J. y Board, R.G. 1973. Properties of Gram negative aerobes isolated from meats. *Journal Food Science*, 38: 303 – 305.
- Del Valle, Y., Mercedes, A., Bettina, L., Guevara, G., Figuera, B.E. y Vallenilla, O.M. 2006. Cambios físico-químicos y microbiológicos observados durante el proceso tecnológico de la conserva del atún. *Zootecnia Tropical* 24.
- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F. and Nychas, G.E. 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions, *International Journal of Food Microbiology* 157, 130–141.
- Doyle, M.E. 2011. Losses and Control Strategies: A Brief Review of the Literature.
- Eburne, R.C. and Prentice, G. 1994. Shelf Life Evaluation of Foods, chapter 8: Modified-atmosphere-packed ready-to-cook and ready-to-eat meat products, SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA, B.V.

- EFSA. 2003. The effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. The EFSA Journal (2003) 14, 1-31.
- EFSA. 2005. Opinion of the scientific panel on biological hazards (BIOHAZ) related to Clostridium spp. in foodstuffs. EFSA Journal 199, 1-65.
- EFSA. 2015. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA. Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level. EFSA Journal; 13(7):4162.
- EFSA. 2016. Scientific Opinion growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4523>
- EFSA. 2017. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards Monitoring and identification of human enteropathogenic Yersinia spp. EFSA Journal (2007) 595, 1-30.
- EFSA. SCIENTIFIC OPINION ADOPTED: 6 December 2017 doi: 10.2903/j.efsa.2018.5134 Listeria monocytogenes contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/595>
- Eklund, M.W., Poysky, F.T. y Wieler, D.I. 1967. Characteristics of Clostridium botulinum type F isolated from the pacific coast of the United States. Applied Microbiology 15(6), 1316-1323.
- Emborg, Jette. 2007. Morganella psychrotolerans - Identification, histamine formation and importance for histamine fish poisoning. Ph.D. Thesis. <https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/4687217/afhandling+til+orbit.pdf>
- European Salmon Smokers Association. European Guide To Good Practice For Smoked And/Or Salted And/Or Marinated Fish.
- https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_guidance_essa_smoked-salted-marinated-fish.pdf
- European Union Reference Laboratory for Listeria monocytogenes, 2014. EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT for conducting shelf-life studies on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods. Version 3 – 6 June 2014. Amendment 1 of 21 February 2019.
- FAO. (1988). El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad.
- FAO (1999). Evaluación de la calidad del pescado.
- Fleming, D. and Hunt, D. 2006. Biological Safety Principles and Practices (4th ed.). Washington: ASM Press. EFSA.
- Food Safety Authority of Ireland. 2019. Validation of Product Shelf-life (Revisión 4). www.fsai.ie
- Food Standard Agency. 2017. The safety and shelf-life of vacuum and modified atmosphere packed chilled foods with respect to non-proteolytic Clostridium botulinum, January 2017. <http://www.foodstandards.gov.scot/downloads/vacpacguide.pdf>.
- Food Standards Australia New Zealand. 2011. Agents of Foodborne Illness, http://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/FSANZ_Foodborne%20Illness2.pdf
- Food Standards Australia New Zealand. 2016. Compendium of Microbiological Criteria for Food.

- Freitas, C.A. and Malcata, F.X. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protegée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83:584-602.
- Gallardo, J.M. 1978. El contenido en hipoxantina como índice del grado de frescura del pescado y de los productos pesqueros. *Inf. Téc. Instituto Investigación Pesquero* 58.
- Garrido, V., García-Jalón, I. y Vitas, A.I. 2010. Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. *Food Control* 21, 896–901.
- Gill and Newton. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 43(2):189–195.
- Gonzalo García-Tapia, Guillermo Barba-Quintero, José Alberto Gallegos-Infante, Ramón Pacheco Aguilar, Juan Antonio Ruíz-Cortés, José Alberto Ramírez. 2013. Influence of physical damage and freezing on histamine concentration and microbiological quality of yellowfin tuna during processing. *Food Sci. Technol, Campinas*, 33(3): 463-467.
- Guan, T. Y., and Holley, R. A. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness--a review. *Journal of Environmental Quality*, 32(2), 383-392.
- Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Comunidad de Madrid. Agosto 2012.
- 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
- Hauschild y col., 1985. Toxin production by *Clostridium botulinum* and organoleptic changes in vacuum-packaged raw beef. *Journal of Food Protection* 48: 712–716.
- Hudson, K.D., y col. (2001). Localization of GerAA and Ger AC germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore. *Journal of Bacteriology* 183: 4317 – 4322.
- Hunt, K., Blanc, M., Álvarez-Ordóñez, A. y Jordan, K. 2018. Challenge studies to determine the ability of foods to support the growth of *Listeria monocytogenes*. *Pathogens* 7 (4).
- Hyytiä E., Hielm S., Morkkila M., Kinnunen A. and Korkeala H. (1999). Predicted and observed growth and toxigenesis by *Clostridium botulinum* type E in vacuum-packaged fishery product challenge tests. *International Journal of Food Microbiology* 47: 161-169.
- IFST.1993. Shelf Life of Foods – Guidelines for its Determination and Prediction. Institute of Food Science & Technology, London.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2005. Microorganisms in food 6: Microbial Ecology of Food Commodities. Kluwer Academic. Plenum Publishers. ISBN: 0-306-48676-8.
- Jay, J.J., Loessner, M.J.; Golden, D.A. 2005. Microbiología moderna de los alimentos. 5ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza. (España).

- Kilcast, D. and Subramaniam, P. Preface, Editor(s): David Kilcast, Persis Subramaniam, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, The Stability and Shelf-Life of Food, Woodhead Publishing, 2000, Pages ix-x, ISBN 9781855735002. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855735002500047>).
- Koutsoumanis, K., Pavlis, A., Nychas, G.E. and Xanthiakos, K. 2010. Probabilistic Model for *Listeria monocytogenes* Growth during Distribution, Retail Storage, and Domestic Storage of Pasteurized Milk. *Applied And Environmental Microbiology*, Apr. 2010, p. 2181–2191.
- Lake, R., Hudson, A., Cressey, P. 2004. Risk Profile: *Yersinia Enterocolitica* in Pork Prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority contract for scientific services. (http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risk_Profile_Yersinia-Science_Research.pdf).
- Leatherhead Food Research et al. 2018. Guidelines for Setting Shelf Life of Chilled Foods in Relation to Non-proteolytic *Clostridium botulinum*. <https://www.leatherheadfood.com/files/2018/07/Non-Proteolytic-Clostridium-Botulinum-Shelf-Life-Guidance-FINAL-1st-Ed-9.7.18.pdf>
- Lerke, P., Adams, R. y Farber, L. 1965. Bacteriology of spoilage of fish muscle. III. Characteristics of spoliros. *Appl. Microbiol.*, 13: 625 – 630.
- Low, J. C. y Donachie, W. 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Veterinary journal*, 153(1), 9-2.
- Lulietto, M.F., Sechi, P., Borgogni, E. and Cenci-Goga, B.T. 2016. Meat Spoilage: A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Italian Journal of Animal Science*. (<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4081/ijas.2015.4011>).
- Mataragas, M. and Drosinos, E.H. 2007. Shelf Life Establishment of a Sliced, Cooked, Cured Meat Product Based on Quality and Safety Determinants. *Journal of Food Protection*, Vol. 70, No. 8, 1881–1889.
- Meat & Livestock Australia. 2016. Shelf life of Australian red meat, <https://www.mla.com.au/globalassets/mla-corporate/research-and-development/program-areas/food-safety/pdfs/shelf-life-of-australian-red-meat-2nd-edition.pdf>
- Mezencev, R. y Klement, C. (2017). Foodborne botulism – a re-emerging public health challenge. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 66(1): 39 – 48.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (Eds.). (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed.). Washington: ASM Press.
- NACMCF Considerations for establishing safety-based consume-by date labels for refrigerated ready-to-eat foods. Adopted, 2004. https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/6732987a-9fbc-475f-84c3-bcbd94d5d736/NACMCF_JFP_Manuscript_05-071+.pdf?MOD=AJPERES
- New Zeland Food safety Authority, Data Sheets, <http://www.mpi.govt.nz/food-safety/food-safety-and-suitability-research/food-risk-assessment/hazard-data-sheets/data-sheets/>;
- Página web Center for Disease Control and Prevention DC. (<https://www.cdc.gov/yersinia/faq.html>).

- Pathogen Data Sheets. Government of Canada. (<https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment.html>).
- Paidhungat, M. y Setlow, P. (2001). Spore germination and outgrowth, p. 537 – 548. En Sonenshein, A.L., Hoch, J.A: y Losick, R. (ed.), *Bacillus subtilis and its relatives: from gens to cells*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Peck, M.W., Goodburn, K.E., Betts, R.P. and Stringer, S.C. 2006. *Clostridium botulinum* in vacuum packed (VP) and modified atmosphere packed (MAP) chilled foods, Final Project Report, Institute of Food Research.
- Peck, M.W. 2019. Risk Assessment of Botulism from Chilled, VP/MAP (Vacuum Packed/Modified Atmosphere Packed) Fresh Meat held at 3°C to 8°C. Meat and Livestock Australia Limited. <https://www.mla.com.au/research-and-development/search-rd-reports/final-report-details/Risk-Assessment-of-Botulism-from-Chilled-VP-MAP-Vacuum-Packed-Modified-Atmosphere-Packed-Fresh-Meat-held-at-3C-to-8C/3929>
- Pierina Visciano, Maria Schirone, Rosanna Tofalo and Giovanna Suzzi. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Front Microbiol.* 2012; 3: 188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366335/>
- Pooni and Mead. 1984. The contribution of carcass contamination and the boning process to microbial spoilage of aerobically stored pork. *Microbial Food Spoilage*.
- Preeti Singh, Ali Abas Wani, Sven Saengerlaub, Horst-Christian Langowski. 2011. Understanding Critical Factors for the Quality and Shelf-life of MAP Fresh Meat: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:146–177.
- Rahman, A., Bonny, T.S., Stonsaovapak, S. and Ananchaipattana, C. 2011. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks, *Journal of Pathogens* Volume 2011 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335472/>).
- Real Decreto 126/2015, de 27 de febrero, por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor.
- Reglamento (CE) N° 852/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- Reglamento (UE) N° 1169/2011, del parlamento europeo y del consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n o 1924/2006 y (CE) n o 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n o 608/2004 de la Comisión.

- Reglamento (CE) N° 178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo del 28 de enero del 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.
- Reglamento (CE) N° 2073/2005, de la Comisión, del 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Shin-Hee Kim, Begon A Ben-Gigirey, Jorge Barros-Velázquez, Robert J. Price, and Haejung An. 2000. Histamine and Biogenic Amine Production by *Morganella morganii* Isolated from Temperature-Abused Albacore. *Journal of Food Protection*, Vol. 63, No. 2, 2000, Pages 244–251.
- S.-H. Kim, H. An, C.-I Wei, W. Visessanguan, S. Benjakul, M.T. Morrissey, Y.-C. Su, And T.P. Pitta. 2006. Molecular Detection of a Histamine Former, *Morganella morganii*, in Albacore, Mackerel, Sardine, and a Processing Plant. *Journal of Food Science* 68(2):453 – 457.
- Sperber, W.H. and Doyle, M.P. Editors *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. 2009. Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
- Steele, R. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food*, Woodhead Publishing, 2004, Page ii, ISBN 9781855737327, <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-732-7.50001-9>.
- Stringer, S.C. et al. 2011, Demonstration of the safe shelf-life of fresh meat with respect to non-proteolytic *Clostridium botulinum*.
- <https://pork.ahdb.org.uk/media/72703/demonstration-of-the-safe-shelf-life-of-fresh-meat-with-respect-to-non-proteolytic-clostridium-botulinum-final-report.pdf>
- Solomon, H.M., Kautter, D.A., Lilly, T. and Rhodehamel, E.J. 1990. Outgrowth of *Clostridium botulinum* in shreds cabbage at room temperature under a modified atmosphere. *Journal of Food Protection* 53, 831-845.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P. y Bremer, P.J. (2018). Impact of temperature, nutrients, pH and cold storage on the germination, growth and resistance of *Bacillus cereus* spores in egg White. *Food Res Int.* 106: 394 – 403.
- Tompkin, R.B. 1996. The Significance of time-temperature to growth of foodborne pathogens during refrigeration at 40-50°F. Presented during the Joint FSIS/FDA Conference on Time/Temperature. November 18, Washington, DC. https://meathaccp.wisc.edu/Model_Haccp_Plans/assets/raw_ground/TompkinPaper.pdf
- Vallé, M., Malle, P. y Bouquelet, S. (1996). Liquid Chromatographic Determination of fish decomposition indexes from analyses of Plaice, Whiting and Herring. *Journal AOAC International* 79: 1134-1140.
- Woodburn et al, 1979. Heat inactivation rates of botulinum toxins A, B,E and F in some foods and buffers. *Journal of Food Science* 44: 1658–1661.
- Hao, Y.Y. and Brackett, R. E. 1993. Growth of *Escherichia coli* 0157:H7 in Modified Atmosphere. *Journal of Food Protection*, Vol. 56, No. 4, 330-332.

