

Directrices en materia de higiene para el control de la *Listeria monocytogenes* en la producción de hortalizas ultracongeladas

Resumen:

Se recomienda adoptar un enfoque multidisciplinar para el control del patógeno ambiental *Listeria monocytogenes* en la producción de hortalizas ultracongeladas. Un sistema de gestión de la seguridad de los alimentos, basado en programas de prerequisites (PPR, centrados en la higiene y organización del entorno de producción) y un plan de análisis de peligros y puntos de control crítico (plan de APPCC, centrado en el control del proceso), debe centrarse plenamente en la *Listeria monocytogenes* a fin de impedir que este organismo forme colonias y persista en formaciones de biopelículas complejas, o de prevenir la contaminación por dicho organismo después del tratamiento (térmico) llevado a cabo durante la manipulación posterior antes del envasado. En el gráfico 1 se muestran los distintos PPR y el plan de APPCC pertinentes para la prevención y el control de la *Listeria monocytogenes*. Es preciso establecer un control ambiental para verificar la eficacia de los PPR y el plan de APPCC aplicados y evaluar la posible acumulación de *Listeria monocytogenes* en el entorno de producción en general. Por último, las especificaciones del producto final deben ayudar a los explotadores de empresas alimentarias (EEA) a establecer niveles intermedios relativos a la *L. monocytogenes* factibles en los productos finales cuando se haya implantado un sistema de gestión de la seguridad de los alimentos apropiado. La comunicación de los riesgos y la información dirigida a los usuarios de hortalizas ultracongeladas deben indicar claramente cómo hacer un uso adecuado de los productos congelados con el fin de evitar posibles usos indebidos. Además de estas actividades de gestión técnica, un EEA también debe implantar una cultura de seguridad y concienciar al conjunto de la organización de la producción, y en todos sus aspectos, acerca de la prevención y el control de los peligros para la seguridad de los alimentos y los problemas de higiene. Las presentes directrices se refieren a las hortalizas congeladas, escaldadas y sin escaldar, que no se consideran listas para el consumo. Los EEA que se proponen comercializar hortalizas congeladas listas para el consumo también pueden beneficiarse de seguir las presentes directrices. Estos EEA, no obstante, deberían seguir medidas adicionales de prevención y control para garantizar la seguridad de los productos listos para el consumo, aunque no estén incluidas en las directrices aquí expuestas.

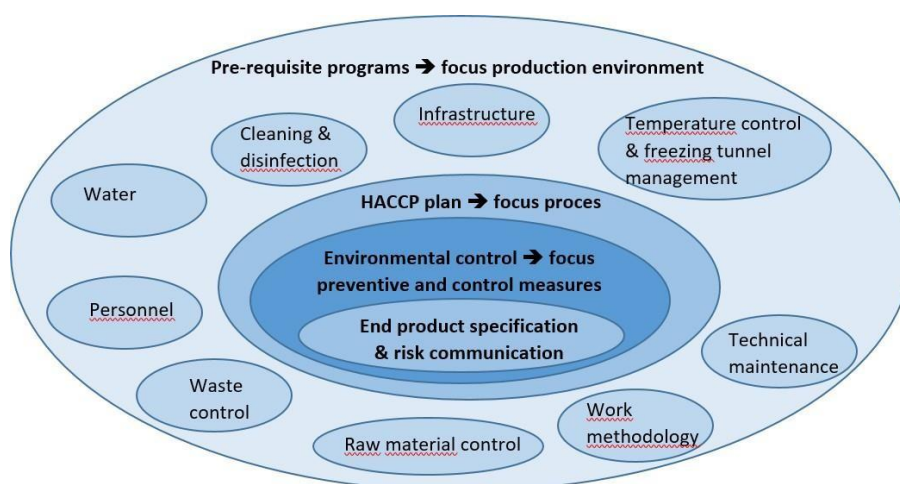


Gráfico 1. Concepto de PPR (centrados en el entorno de producción en general), plan de APPCC (centrado en el proceso de producción y las distintas fases de transformación), control ambiental (como verificación de las medidas de prevención y control llevadas a cabo) y, por último, especificaciones del producto final y comunicación de los riesgos a los usuarios (entre empresas, B2B, y de empresas a consumidores, B2C) a fin de prevenir y controlar la posible contaminación por *L. monocytogenes* durante la producción de hortalizas ultracongeladas.

Ámbito de aplicación:

Las directrices en materia de higiene aquí expuestas, que incluyen un ejemplo de plan de APPCC, se refieren a la producción comercial de hortalizas ultracongeladas (escaldadas y sin escaldar) con arreglo a la legislación aplicable de la Unión Europea. El objetivo es establecer unas directrices europeas para la producción y la gestión de la seguridad alimentaria de las hortalizas ultracongeladas, que abarquen desde la recepción de las materias primas hasta los productos finales envasados listos para ser utilizados en la siguiente fase de la cadena agroalimentaria, ya sea B2B (de empresa a empresa) o B2C (de empresas a los consumidores). Los EEA que se dediquen a la producción o el comercio de hortalizas ultracongeladas pueden utilizar el presente documento como punto de partida para su propio sistema de gestión de la seguridad de los alimentos, la elaboración de buenas prácticas, los PPR y los principios del APPCC. Se hace hincapié en el control del factor de peligro *L. monocytogenes*. En el presente documento no se abordarán otros peligros microbiológicos pertinentes para estas actividades ni otro tipo de peligros (p. ej., peligros químicos, físicos o alérgenos). Además de hortalizas congeladas, algunos EEA también producen hierbas culinarias o frutas congeladas, si bien estos productos no entran dentro del ámbito de aplicación de las directrices aquí expuestas. Las presentes directrices se refieren a las hortalizas congeladas, escaldadas y sin escaldar, que no se consideran listas para el consumo. Los EEA que se proponen comercializar hortalizas congeladas listas para el consumo (LPC) también pueden beneficiarse de seguir las presentes directrices. Estos EEA, no obstante, deberían seguir medidas adicionales de prevención y control para garantizar la seguridad de los productos LPC, aunque no estén incluidas en las directrices aquí expuestas.

Legislación de la UE aplicable a la producción de hortalizas ultracongeladas

Los requisitos generales de seguridad de los alimentos, incluida la obligación de comercializar únicamente alimentos seguros, se establecen en el Reglamento (CE) n.º 178/2002. La producción según normas higiénicas de los productos alimenticios en la UE está contemplada en el Reglamento (CE) n.º 852/2004, y en particular en su anexo II. En las presentes directrices, se ofrecen ejemplos prácticos para complementar dichas disposiciones generales. Al elaborar esta guía, se ha respetado el artículo 9 del Reglamento (CE) n.º 852/2004, relativo a las guías comunitarias. La Comunicación de la Comisión C278/2016, sobre la gestión de la seguridad alimentaria, se toma como base para las buenas prácticas, los PPR y los principios del APPCC. Los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios están regulados en el Reglamento (CE) n.º 2073/2005. En el anexo I se enumera toda la legislación pertinente.

Documentos pertinentes además de las presentes directrices

Existen orientaciones adicionales disponibles a través de las publicaciones pertinentes del Codex Alimentarius, los dictámenes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), las prácticas generales de higiene desarrolladas por distintas autoridades nacionales, publicaciones científicas y libros (enumerados en el anexo II).

Consulta de partes interesadas pertinentes

A la hora de establecer las directrices, se organizaron consultas con grupos de partes interesadas: a) Copa Cogeca (producción primaria); b) Hotrec (actividades de restauración) y FoodServiceEurope (actividades de *catering*); c) ChilledFOODAssociation (empresas transformadoras de platos listos para el consumo), FoodDrinkEurope (industria transformadora), FRUCOM (importadores de frutas y hortalizas), CULINARIA (salsas, especias y hierbas culinarias), FRESHFEL (frutas y hortalizas frescas, incluidos los productos recién cortados, conocidos como «cuarta gama»); d) EuroCommerce (organizaciones de comercio minorista), y e) BEUC (organización de consumidores).

CLÁUSULA DE EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

Estas directrices son una recomendación y no tienen valor jurídicamente vinculante. Su elaboración tiene fines informativos únicamente. Profel no garantiza la exactitud de la información suministrada ni acepta

responsabilidad alguna por el uso que se haga de esta. Por tanto, los usuarios deberán adoptar todas las precauciones necesarias antes de utilizar esta información, en cuyo caso lo harán exclusivamente bajo su responsabilidad. La obligación de velar por el cumplimiento de la legislación europea en materia de seguridad de los alimentos corresponde a la Comisión Europea y a las autoridades competentes de los Estados miembros de la UE. Se invita a los EEA dedicados a la producción o al comercio de hortalizas ultracongeladas a que se pongan en contacto con la autoridad competente para obtener información completa sobre los requisitos legales vigentes en el Estado miembro de establecimiento.

Índice

1. Introducción

1.1. Perfil de la industria

En Europa, las hortalizas ultracongeladas son producidas por unas 145 empresas, tanto grandes empresas multinacionales que producen en varios Estados miembros como numerosas pymes. Profel, la Asociación Europea de Industrias Transformadoras de Frutas y Hortalizas, y en cierta medida la AETMD, la Asociación Europea de Empresas Transformadoras de Maíz Dulce, son las únicas organizaciones que representan al sector de las hortalizas ultracongeladas. Sus miembros son tanto pymes como empresas multinacionales, y dan empleo a más de 80 000 personas. El volumen de negocios anual combinado de los miembros de Profel asciende aproximadamente a 22 000 millones EUR, con una producción de cerca de 5,5 millones de toneladas solo en el sector de las hortalizas (tanto enlatadas como ultracongeladas). La producción anual estimada en la UE únicamente de hortalizas ultracongeladas* asciende a cuatro millones de toneladas. Existen aproximadamente 180 puntos de producción repartidos en 18 Estados miembros de la UE. La afiliación a Profel tiene lugar principalmente a través de sus asociaciones nacionales. No todos los países cuentan con asociaciones nacionales de hortalizas ultracongeladas, y algunas empresas están afiliadas a Profel directamente. Si bien no existen cifras oficiales, las asociaciones nacionales calculan que los miembros de Profel representan el 80 % de la producción de hortalizas ultracongeladas en la UE.

* Excluidas las patatas y los tomates, pero incluido el maíz dulce ultracongelado.

1.2. Perfil del producto

Los grupos de productos considerados son las hortalizas ultracongeladas, que comprenden las raíces y los tubérculos, los bulbos, los frutos y pepónides, las hortalizas del género *Brassica*, las verduras de hoja, las flores comestibles, las leguminosas y las hortalizas de tallo. Las frutas y las hierbas culinarias no se incluyen en las presentes directrices.

Las hortalizas ultracongeladas incluidas pueden estar escaldadas o sin escaldar, y también pueden estar ultracongeladas individualmente (*Individually Quick-frozen*, IQF), cuando los productos están separados unos de otros, o ultracongeladas en bloque. Se envasan en embalajes a granel para el mercado B2B y su transformación ulterior en la cadena alimentaria (p. ej., servicios de *catering*, producción de platos listos para el consumo) o en envases pequeños destinados a la venta al consumidor, para los mercados B2C. Los productos pueden comercializarse bien como un único producto, bien como un producto mezclado con otras hortalizas ultracongeladas o combinado con otros productos alimenticios, como arroz, pasta, salsas o pescado o carne ultracongelados.

1.3. *Listeria monocytogenes*

Si bien aún se considera un patógeno zoonótico, la *L. monocytogenes* está ampliamente extendida en la naturaleza y en entornos de transformación de alimentos. Se ha conseguido aislar del suelo, de vegetación, de aguas residuales, del agua, de piensos y de excrementos de animales sanos, incluidos seres humanos. Puede introducirse en entornos de transformación de alimentos a través de las materias primas entrantes y el desplazamiento de personal y equipos. La *L. monocytogenes* puede formar colonias en forma de biopelículas en los equipos de transformación de alimentos y en las superficies en contacto (o sin contacto) con los alimentos. Unos procedimientos de limpieza y desinfección inadecuados pueden dar lugar a una persistencia de la bacteria durante períodos prolongados en los entornos de transformación de alimentos. La *L. monocytogenes* se ha aislado en una variedad de diversos productos alimenticios, como carne fresca y ultracongelada, productos cárnicos cocinados, pescado ahumado, leche cruda, queso (blando), helados, ensaladas preparadas, hortalizas frescas o mínimamente transformadas, etc. (Uyttendaele *et al.*, 2018; EFSA y ECDC, 2018). La *L. monocytogenes* es una bacteria grampositiva, no formadora de esporas, en forma de vara (0,5 µm de ancho y 1-2 µm de largo) y anaerobia facultativa. Aunque su rango óptimo de temperaturas oscila entre 30 y 37 °C, puede crecer en un rango de temperaturas amplio de entre 1 y 45 °C. Al ser una bacteria psicrotolerante, puede sobrevivir e incluso

crecer a temperaturas de refrigeración. Este organismo es particularmente resistente al estrés ambiental y es capaz de sobrevivir o multiplicarse en una amplia gama de condiciones desfavorables de pH (4,6-9,4, idealmente 7,0) y actividad acuosa (a_w) (0,92 como mínimo), si bien puede lograrse una reducción logarítmica de 6 mediante pasteurización (dos minutos a 70 °C) o cualquier otro tratamiento térmico equivalente (Uyttendaele *et al.*, 2018).

La especie *L. monocytogenes* se divide en trece serovariedades según sus antígenos somáticos y flagelares. Desde 2005, estas serovariedades han sido sustituidas por cinco genoserogrupos determinados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP): IIa (serovariedades 1/2a y 3a), IIb (serovariedades 1/2b y 3b), IIc (serovariedades 1/2c y 3c), IVb (serovariedades 4b, 4d y 4e) y L (otras serovariedades). De entre ellas, el tipo IVb, seguido del IIa y el IIb, son los genoserogrupos más frecuentemente implicados en casos humanos (EURL – *L. monocytogenes*, 2019). En los últimos años, se ha demostrado que la subtipificación basada en la secuenciación completa del genoma puede conseguir una discriminación adicional significativa y, por tanto, contribuir al éxito de las investigaciones de brotes. Dentro de la UE, la listeriosis es una de las enfermedades prioritarias para las que en 2018 se puso en marcha una supervisión supranacional reforzada mediante la secuenciación completa del genoma (Van Walle *et al.*, 2018).

La *L. monocytogenes* es la única especie de *Listeria* que es patógena para el ser humano y es el agente causal de la listeriosis (McLauchlin *et al.*, 2004). La infección por *L. monocytogenes* puede provocar dos tipos de enfermedades humanas: la forma no invasiva de la listeriosis afecta al aparato digestivo y provoca síntomas como fiebre, mialgias y en ocasiones síntomas gastrointestinales (náuseas o diarrea), mientras que la listeriosis invasiva, de mayor gravedad, se asocia a manifestaciones clínicas de infección del sistema nervioso central, septicemia y bacteriemia. Debido a la capacidad de invasión de la *L. monocytogenes*, la mortalidad por listeriosis se asocia en particular a poblaciones de alto riesgo, por ejemplo los individuos con inmunodeficiencia, como es el caso de las personas con neoplasias hematológicas malignas (p. ej., leucemia), las personas con cáncer de hígado, las personas mayores (de más de 74 años), las mujeres embarazadas y los neonatos (Buchanan *et al.*, 2017; McLauchlin *et al.*, 2004).

En el período transcurrido entre 2015 y junio de 2018, en cinco Estados miembros de la UE (Austria, Dinamarca, Finlandia, Reino Unido y Suecia) se notificó un brote de infecciones invasivas por *L. monocytogenes*, clasificada mediante secuenciación completa del genoma dentro del serogrupo IVb, ST6 (tipo de secuencia 6), y vinculada al maíz ultracongelado y posiblemente a otras hortalizas ultracongeladas: se confirmaron 47 casos y 9 pacientes fallecieron a causa de la infección o con ella (tasa de mortalidad del 19 %). La *L. monocytogenes* ST6 es un clon hipervirulento de la *L. monocytogenes* que se asocia a formas neurológicas de listeriosis (EFSA, 2018a). No obstante, pese a la variabilidad observada en su potencial de virulencia, prácticamente cualquier cepa de *L. monocytogenes* tiene la capacidad de provocar listeriosis en seres humanos debido a la compleja interacción entre el patógeno, los alimentos y el huésped. Esta fue la primera ocasión en que un brote de listeriosis en la UE se vinculó a hortalizas ultracongeladas (EFSA, 2018a), y dio comienzo la redacción del presente documento de orientación.

1.4. Definiciones

Agua limpia: «agua que no compromete la inocuidad de los alimentos en las circunstancias de su uso». Es el agua de mar limpia (agua de mar natural, artificial o purificada o el agua salobre que no contenga microorganismos, sustancias nocivas o plancton marino tóxico en cantidades que puedan afectar directa o indirectamente a la calidad sanitaria de los productos alimenticios) y el agua dulce de calidad higiénica similar [Reglamento (CE) n.º 852/2004; Comunicación de la Comisión C163/2017].

Agua reciclada: agua reutilizada en el proceso de producción, con o sin tratamiento previo (p. ej., filtración, desinfección).

B2B: del inglés *business to business* (de empresa a empresa), refiriéndose a hortalizas ultracongeladas envasadas para su transformación posterior en la industria alimentaria o para actividades de *catering*.

B2C: del inglés *business to consumers* (de empresa a consumidores), refiriéndose a hortalizas ultracongeladas envasadas para el consumidor final (distribuidas por minoristas en envases pequeños).

Biopelícula: estructura tridimensional que se forma en superficies y contiene un elevado número de microorganismos adheridos a la superficie mediante orgánulos y sustancias excretadas (p. ej., sustancias poliméricas extracelulares, como glucoproteínas) (Devlieghere *et al.*, 2013).

BPH (buenas prácticas de higiene) y BPF (buenas prácticas de fabricación): paquete de prácticas y condiciones preventivas para garantizar la seguridad de los alimentos producidos. Las BPH insisten más en la necesidad de higiene, mientras que las BPF hacen hincapié en unas metodologías de trabajo correctas (Comunicación de la Comisión C278/2016).

Desinfectante: producto aplicado para la desinfección de las superficies después de su limpieza. Los biocidas deben definirse conforme al Reglamento (CE) n.º 528/2012.

Detergente: producto (químico) empleado para la limpieza de superficies (eliminación de materia orgánica de superficies) (Devlieghere *et al.*, 2013).

EEA (explotador de empresa alimentaria): las personas físicas o jurídicas responsables de asegurar el cumplimiento de los requisitos de la legislación alimentaria en la empresa alimentaria bajo su control [Reglamento (CE) n.º 178/2002].

Escaldado: proceso térmico habitualmente aplicado a un alimento con el fin de inactivar las enzimas o fijar el color del producto (CAC, 1976).

EURL: laboratorio de referencia de la Unión Europea.

Factor de peligro: todo agente biológico, químico o físico presente en un alimento o en un pienso, o toda condición biológica, química o física de un alimento o un pienso que pueda causar un efecto perjudicial para la salud [Reglamento (CE) n.º 178/2002; Comunicación de la Comisión C278/2016].

HVAC: sistema de calefacción, ventilación y aire acondicionado

IQF (= ultracongelados individualmente, del inglés *individually quick-frozen*): alimento ultracongelado en el que los productos están separados/sueltos (CAC, 1976).

LNR: laboratorio nacional de referencia

LPC: alimentos listos para el consumo [Reglamento (CE) n.º 2073/2005]: 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.

Medición del ATP: los dispositivos de detección de ATP (trifosfato de adenosina) emplean la bioluminiscencia para indicar el nivel de ATP residual presente en superficies frotadas (Turner, 2010).

Nicho: elemento que describe la ecología de una especie, que puede referirse a su hábitat, su función en el ecosistema, etc. (Pocheville, 2015).

NLPC: alimentos no listos para el consumo: alimentos, en contraposición a los alimentos LPC, destinados por el productor a ser cocinados o sometidos a otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos.

PCC (puntos de control crítico): fase en la que puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos o para reducirlo a un nivel aceptable (1). Los PCC más habituales para controlar los peligros microbiológicos son los requisitos de temperatura, p. ej. la temperatura de almacenamiento o transporte, y las condiciones relativas al tiempo o la temperatura para reducir o eliminar un peligro (por ejemplo, la pasteurización). Otros PCC pueden incluir la comprobación de que los embalajes están limpios e intactos, la comprobación de la existencia de peligros físicos mediante el tamizado o la detección de metales, o la del tiempo/temperatura del aceite de freír para evitar procesos químicos contaminantes (Comunicación de la Comisión C278/2016).

Plan de APPCC: un documento, que puede ser electrónico, que describe íntegramente los procedimientos basados en el APPCC. El plan inicial de APPCC debe actualizarse en caso de que se den cambios en la producción y habrá de completarse con los registros de los resultados del seguimiento y la verificación, y de las medidas correctivas adoptadas (Comunicación de la Comisión C278/2016).

Procedimientos basados en el APPCC o «APPCC»: procedimientos basados en los principios del análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC), es decir, un sistema de autocontrol que permite detectar, evaluar y controlar peligros significativos para la inocuidad de los alimentos en consonancia con los principios del APPCC (Comunicación de la Comisión C278/2016).

Programa(s) de prerrequisitos (PPR): prácticas preventivas y condiciones necesarias antes de la aplicación del APPCC y durante esta, y que son esenciales para la seguridad alimentaria. Los PPR necesarios dependen del segmento de la cadena alimentaria en que funciona el sector y del tipo de sector. Algunos ejemplos de términos equivalentes son las buenas prácticas agrícolas (BPA), la buena práctica veterinaria (BPV), las buenas prácticas de fabricación (BPF), las buenas prácticas de higiene (BPH), las buenas prácticas de producción (BPP), las buenas prácticas de distribución (BPD) y las buenas prácticas de comercialización (BPC) (Comunicación de la Comisión C278/2016).

Programas de prerrequisitos operativos (PPRO): puntos del proceso de producción con un menor riesgo para la seguridad alimentaria o en que no existen límites mensurables. Estos puntos pueden ser controlados a través de medidas básicas generales de control más elaboradas pertenecientes al PPR, p. ej., controles más frecuentes, registro, etc. Debido al control y la adaptación regular del proceso / de los requisitos del producto puede considerarse que estos riesgos están controlados. No es necesaria una medida correctiva inmediata respecto del producto (Comunicación de la Comisión C278/2016).

SGSA [sistema de gestión (o control) de la seguridad de los alimentos]: la combinación de los PPR como medidas de control preventivas; la trazabilidad, la recuperación y la comunicación como preparación; y el plan de APPCC para definir los PCC y/o los PPRO como medidas de control vinculadas al proceso de producción. El SGSA también es la combinación de medidas de control y actividades de aseguramiento. Estas últimas están destinadas a facilitar pruebas de que las medidas de control funcionan adecuadamente, como la validación y la verificación, la documentación y el registro (Comunicación de la Comisión C278/2016).

Ultracongelado: se entiende por «alimentos ultracongelados» aquellos productos alimenticios (Directiva 89/108/CEE y CAC, 1976):

- que hayan sido sometidos a un proceso adecuado de congelación denominado «congelación rápida», que permita rebasar tan rápidamente como sea necesario, en función de la naturaleza del producto, la zona de máxima cristalización que dé como resultado que la temperatura del producto en todas sus partes —tras la estabilización térmica— se mantenga sin interrupción en temperaturas iguales o inferiores a -18 °C y
- que sean comercializados de modo que indiquen que poseen esta característica.

2. Buenas prácticas y programas de prerrequisitos (PPR)

Los PPR son componentes fundamentales de la prevención y el control de la higiene y la seguridad de los alimentos en el marco del sistema de gestión de la seguridad de los alimentos implantado por los EEA. Los PPR incluyen buenas prácticas de higiene y de fabricación, así como todas las medidas adoptadas para prevenir la contaminación o la formación de excrecencias por microorganismos. Las presentes directrices siguen la estructura de la Comunicación de la Comisión sobre la gestión de la seguridad alimentaria (C278/2016) y describen el papel de cada PPR en la prevención o el control de la *L. monocytogenes*. Sin embargo, de los doce PPR enumerados, no todos cumplen una función en la prevención o el control de la *Listeria monocytogenes*, por lo que se han excluido tres: el PPR de control de las plagas, el PPR de alérgenos y el PPR de contaminación física y química procedente del entorno de producción.

2.1. Limpieza y desinfección

La limpieza y desinfección es un PPR importante para la prevención y el control de la *Listeria monocytogenes*. Es preciso que los EEA cuenten con un **plan de limpieza y desinfección** para garantizar que todas las zonas, la maquinaria y los equipos pertinentes —en contacto directo o indirecto con los alimentos— de las instalaciones se limpien/desinfecten periódicamente.

El **plan de limpieza** incluye la zona, la maquinaria, los equipos y los dispositivos (en contacto o no con los alimentos) que deben limpiarse; el desmontaje de equipos; el método de limpieza [p. ej., limpieza con espuma, limpieza externa (*cleaning-out-of-place* o COP) o limpieza *in situ* (*cleaning-in-place* o CIP)]; los tipos y concentraciones de los productos de limpieza; el tiempo y la temperatura (si procede) de las soluciones de

limpieza; el caudal (velocidad) o la presión de la solución de limpieza (si procede) y la frecuencia con la que se limpia. Este plan incluye asimismo las zonas identificadas en las que es probable que se acumule humedad, condensación, infestaciones de moho, suciedad o bacterias, y describe cómo evitar que esto suceda. En el caso de la limpieza externa (COP), por ejemplo, de tanques de lavado y tuberías, se ha de procurar evitar la contaminación cruzada tras desmontar las piezas de los equipos (p. ej., no se deben colocar los equipos directamente en el suelo o sobre otras superficies sucias). Debe evitarse que el agua del suelo o equipos sucios salpique sobre equipos limpios. Por ello, es preferible no usar mangueras de alta presión durante la limpieza y desinfección.

Además de la limpieza, unas **actividades de desinfección** adecuadas evitarán y eliminarán la acumulación microbiana y la formación de biopelículas. Se aconseja contar con un plan de desinfección similar al plan de limpieza. Para la desinfección, únicamente se aplicarán biocidas autorizados de conformidad con las especificaciones técnicas de los proveedores (p. ej., concentración, pH del agua, dureza del agua, eficacia contra los organismos objetivo, necesidad de aclarado, posibilidad de uso en un sistema de pulverización, etc.). Se ha comprobado que la aplicación rotativa de desinfectantes ofrece una eficacia y prevención más duraderas de *L. monocytogenes* de nichos y biopelículas. Puede aplicarse agua caliente o vapor para desinfectar soportes o equipos de difícil acceso y limpieza, incluidos los puntos en los que podría anidar *L. monocytogenes*.

En caso de **sospecharse la existencia de una biopelícula**, deberán llevarse a cabo actividades de limpieza y desinfección específicas para eliminarla, pues las actividades convencionales de limpieza y desinfección no serán adecuadas debido a la resistencia de la biopelícula. No obstante, es más importante evitar la formación de biopelículas y mantener una vigilancia ambiental (véase la sección 4) para detectar cualquier tipo de contaminación ambiental en una fase temprana.

Es necesario establecer una **validación de los planes de limpieza y desinfección** (a fin de determinar si son adecuados para retirar restos de productos y materia orgánica, así como para eliminar las bacterias en suficiente medida). Por ello, debe llevarse a cabo un muestreo ambiental intensivo de las zonas que se hayan limpiado (p. ej., con mediciones del ATP para evaluar la eliminación de materia orgánica) y deben establecerse zonas desinfectadas para los distintos grupos específicos de bacterias (p. ej., eliminación de bacterias gramnegativas y grampositivas, levaduras o mohos), con el fin de evaluar la eficacia de los agentes desinfectantes aplicados, su concentración, tiempo de contacto, etc. Dentro del plan de limpieza y desinfección, los EEA deben estudiar la posibilidad de seguir una **clasificación de los materiales en contacto con alimentos** y la correspondiente frecuencia de limpieza y desinfección (tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo de clasificación de equipos y dispositivos en el marco de la frecuencia de limpieza y desinfección

Tipo	Descripción	Ejemplos de ubicaciones
1	Superficies en contacto directo con los alimentos	Interior de tanques, embalajes y aparatos transportadores, tolvas, interior de tuberías
2	Superficies que no están en contacto con los alimentos muy próximas a superficies que sí lo están	Soportes para alojar equipos, suelos o desagües directamente junto a superficies en contacto con los alimentos.
3	Superficies más alejadas que no están en contacto con los alimentos y que podrían dar lugar a contaminación	Vehículos elevadores, ruedas de cubos de basura o dispositivos, limpiadores de suelas para el personal, paredes, suelos y desagües que no estén en contacto directo con las superficies en contacto con los alimentos.
4	Superficies que no están en contacto con los alimentos y zonas alejadas del entorno de transformación	Pasillos fuera de la zona de producción, zonas en las que se almacenan materias primas o productos acabados. Soportes para alojar equipos, paredes, suelos o desagües NO directamente junto a superficies en contacto con los alimentos.

En principio, las ubicaciones del tipo 1 se limpian y desinfectan con más frecuencia que las de los tipos 2, 3 y 4 (tipo 1 > 2 > 3 y 4), y la frecuencia también puede determinarse en función del régimen de higiene de la zona en la que se encuentren o a la que se asignen los equipos e instalaciones (véase el punto 2.5, sobre la zonificación).

En principio, las «zonas seguras» requieren una mayor frecuencia de limpieza y desinfección que los regímenes de alto nivel de higiene y los de bajo nivel de higiene. Debe crearse una lista de todas las posibles superficies en contacto con los alimentos de cada zona y definirse la necesidad de limpieza y desinfección (frecuencia).

Equipos y superficies en contacto DIRECTO con los alimentos (tipo 1, tabla 1)

Los equipos y las superficies en contacto directo con los alimentos (p. ej., túneles de congelación, cintas transportadoras, tanques de lavado, pesadoras multicabezal, empaquetadoras, interior de tanques, tolvares, interior de tuberías) deben limpiarse y desinfectarse minuciosamente para evitar la contaminación cruzada y la formación de una biopelícula. Es preciso organizar puntos de interrupción en las líneas de producción continuas para la limpieza y desinfección (p. ej., equipos de lavado o escaldado y túneles de congelación que funcionan durante **x** días consecutivos).

Equipos y superficies SIN contacto DIRECTO con alimentos (tipos 2 y 3, tabla 1)

Equipos y superficies que no están directamente en contacto con alimentos, pero que pueden anidar *Listeria monocytogenes* y ser una fuente de contaminación cruzada a través de salpicaduras de agua, aire, aerosoles o materiales. Por tanto, debe evitarse la acumulación de *Listeria monocytogenes* en todo el entorno de la fábrica. Algunos ejemplos típicos de equipos y superficies que no están en contacto directo con los alimentos son: sistemas de ventilación del aire, sistemas de tuberías de agua, desagües de aguas residuales, dispositivos con ruedas, etc. Estos elementos son sensibles a la acumulación de *Listeria monocytogenes* debido al alto contenido de humedad y las temperaturas a menudo no refrigeradas en el entorno de producción. En función de la información específica de la empresa relativa al grado de posible acumulación de restos de productos, materia orgánica, polvo y humedad y el potencial de contaminación cruzada de alimentos o superficies en contacto directo con alimentos, y de la zona a la que pertenecen los equipos e instalaciones (véase el punto 2.5), es preciso establecer una frecuencia determinada de limpieza y desinfección, que habitualmente se recomienda que tenga lugar **x** veces al mes.

Limpieza y desinfección periódicas (tipo 4, tabla 1)

Las infraestructuras más grandes, como plataformas, escaleras, techos, tuberías, etc., que no estén en contacto directo con los alimentos o con otros materiales en contacto con los alimentos deben limpiarse y desinfectarse periódicamente para evitar la acumulación de polvo, restos de productos y materia orgánica, así como para mantener el entorno de producción y almacenamiento en buenas condiciones. En el marco del control de la *Listeria monocytogenes*, es preciso prestar especial atención a los desagües de piso para evitar que contaminen otras superficies del local. Por ello, no deben emplearse mangueras de alta presión para limpiar los desagües durante el proceso de transformación, a fin de evitar que se formen aerosoles; deben usarse herramientas destinadas específicamente a su limpieza y se ha de evitar la limpieza de desagües en períodos de producción. Es necesario elaborar un plan de limpieza periódica (**x** veces cada **x** años) para organizar este tipo de limpieza periódica por zona.

Poner en marcha equipos tras un período de pausa (limpieza antes de la entrada en funcionamiento)

La producción de hortalizas ultracongeladas es altamente estacional. Durante la transformación de un producto determinado, se utilizan varios equipos y dispositivos que se almacenan el resto del año (la temporada baja) (p. ej., sistemas de eliminación de insectos para verduras de hoja, cortadoras). Antes de volver a utilizar estos equipos y dispositivos, es necesario limpiarlos y desinfectarlos minuciosamente para evitar cualquier contaminación cruzada. El EEA debe incluir la limpieza antes de la entrada en funcionamiento en la planificación de la limpieza y la desinfección.

Mantenimiento de utensilios y equipos de limpieza y desinfección

Las herramientas (p. ej., cepillos, fregonas, conductos de distribución de agua) y los equipos (p. ej., máquinas de limpieza a alta presión, equipos de limpieza de suelos) utilizados para la limpieza y la desinfección también requieren mantenimiento y limpieza para evitar la contaminación cruzada. Es aconsejable no dejar las mangueras ni sus boquillas en el suelo o sobre otras superficies sucias cuando no se estén utilizando. Los dispositivos de limpieza del calzado o limpiadores de suelas deben vaciarse, limpiarse y rellenarse como mínimo a diario para evitar la formación de nichos. Es preciso destinar utensilios de limpieza y desinfección específicos

a cada zona (p. ej., usando un código de colores).

Personal involucrado en el saneamiento

El personal involucrado en las actividades de saneamiento debe ocuparse de estas actividades y llevar guantes, ropa y calzado de protección específicos, así como gafas protectoras, que no sean los utilizados durante las actividades habituales de producción. Deben haber recibido formación en saneamiento, incluida la aplicación de productos químicos para sus estaciones de limpieza. El personal que manipule basura, desechos procedentes de barridos del suelo, desagües y residuos de la producción no debe manipular productos alimenticios ni tocar superficies en contacto con los alimentos o material de embalaje, a menos que se cambien primero de bata o uniforme, se laven y desinfecten las manos y desinfecten el calzado con un limpiador de suelas o, preferiblemente, un dispositivo de limpieza de calzado.

Verificación de la limpieza y la desinfección

Tras concluir las actividades de limpieza y desinfección de un tipo de superficie y equipo, una persona distinta de la encargada de la limpieza y la desinfección debe realizar un **control visual** exhaustivo. Este control visual puede formar parte del control de puesta en marcha para liberar líneas de producción para su funcionamiento. En caso de detectarse una contaminación orgánica visual, debe efectuarse de nuevo la limpieza y desinfección antes de poder iniciar la operación. En dicho control visual deben incluirse los puntos y áreas más difíciles de alcanzar.

Se ha de llevar a cabo periódicamente un **muestreo microbiológico de las superficies de contacto** y un análisis para un recuento total en placa u otro tipo de indicador, con objeto de verificar si las actividades de limpieza y desinfección siguen siendo eficaces y realizándose adecuadamente. Pueden utilizarse pruebas de ATP u otros métodos rápidos de control para un examen rápido y la liberación segura de un equipo de producción tras su limpieza y desinfección. No obstante, la verificación de la limpieza y desinfección no puede sustituir al análisis ambiental de la *L. monocytogenes* (véase la sección 4).

2.2. Agua: fuentes, calidad y red de distribución de agua

En la producción de hortalizas ultracongeladas se utilizan grandes volúmenes de agua. El agua (tanto su disponibilidad como su calidad) está sometida a una presión cada vez mayor, por lo que los EEA deben procurar que la reutilización interna de agua no sea una fuente de contaminación cruzada de los productos alimenticios por *L. monocytogenes*. Los EEA deben abordar los siguientes puntos para gestionar el agua y su posible contaminación de los productos alimenticios por *Listeria monocytogenes*:

- a) determinar las fuentes de agua posibles (p. ej., agua corriente, aguas pluviales, aguas subterráneas, agua reciclada tratada);
- b) medir la calidad del agua disponible analizándola (parámetros tanto microbiológicos como químicos → ¿cumple el agua los requisitos de agua potable, agua limpia, agua no potable?);
- c) determinar el uso potencial de agua reciclada o reutilizada (p. ej., reutilizar el agua de refrigeración tras el escaldado como agua de lavado) en determinadas fases de la producción → se ha de hacer una cuidadosa evaluación en este caso para evitar la contaminación cruzada;
- d) determinar la necesidad de desinfectar el agua (basándose en métodos físicos como la radiación ultravioleta, la ósmosis inversa o la desinfección química, aplicando biocidas autorizados como cloro, ácido peracético o ClO₂) en caso de usar agua reciclada, aguas pluviales, agua de drenaje o efluentes con el fin de mejorar su calidad;
- e) controlar y validar las técnicas de desinfección del agua aplicadas (supervisión diaria, control de los residuos químicos en caso de desinfección química del agua);
- f) prever el mantenimiento de los depósitos, los sistemas de tuberías y los sistemas de filtración utilizados para distribuir el agua a fin de evitar la formación de biopelículas y la posible presencia de *L. monocytogenes* →; incluir asimismo elementos del sistema de distribución del agua en el muestreo ambiental (como se enuncia en el punto 4.1);
- g) evitar la contaminación cruzada de otras fuentes de agua con agua de drenaje o efluentes durante la producción;
- h) evitar la acumulación de agua estancada en máquinas, tubos, tuberías y en el suelo;

- i) prevenir la acumulación de agua estancada en desagües y alrededor de estos;
- j) evitar que el goteo, la condensación de accesorios, conductos y tuberías contamine alimentos, superficies en contacto con los alimentos o material de embalaje de alimentos;
- k) asegurarse de que el agua utilizada en el glaseado tenga calidad de agua potable.

Debe elaborarse un **plan de gestión del agua** que incluya todos estos elementos. Debe establecerse asimismo un **plan analítico** adecuado para verificar la calidad del agua empleada, en función de los resultados de pruebas microbiológicas y de sustancias químicas, teniendo en cuenta los requisitos europeos, nacionales o regionales de las autoridades competentes. El dictamen de la EFSA sobre el riesgo de *Listeria monocytogenes* en este tipo de producción también señala el agua utilizada durante el lavado, la refrigeración, etc., como una importante fuente de contaminación (más detalles en EFSA, 2020).

2.3. Control de la temperatura en el entorno de producción y almacenamiento, incluida la gestión de los túneles de congelación

Control de la temperatura en el entorno de producción y almacenamiento

La *L. monocytogenes* es un patógeno ambiental tolerante al frío capaz de proliferar incluso a una temperatura de 0 °C. En condiciones en frío, su ritmo de crecimiento se ralentizará, por lo que el mantenimiento de una cadena de frío evitará la proliferación (rápida) del patógeno. Habitualmente, en un entorno de producción de hortalizas ultracongeladas, no todas las zonas se encuentran en condiciones de temperatura controlada. Como se menciona en el punto 2.1 (limpieza y desinfección), estas zonas requieren una cuidadosa atención durante las actividades de limpieza y desinfección de los equipos tanto en contacto directo como indirecto con los alimentos. Las fluctuaciones de temperatura pueden favorecer unas condiciones de humedad elevada (humedad relativa), la formación de aerosoles o el goteo desde estructuras situadas por encima (p. ej., techos, sistemas de tuberías). Una vez que el producto está ultracongelado, deben garantizarse las condiciones de almacenamiento y transporte ultracongelado a una temperatura de congelación igual o inferior a -18 °C. En caso de que los productos ultracongelados deban manipularse de nuevo (p. ej., para mezclarlos o envasarlos), se recomiendan temperaturas ambiente frías. Salvo que sea viable, los productos ultracongelados deben permanecer (muy) brevemente en condiciones de temperatura ambiente para evitar su descongelación. El EEA debe verificar el tiempo asignado, que dependerá del producto en particular y de la temperatura del entorno.

Gestión de los túneles de congelación

Los túneles de congelación son equipos esenciales en la producción de hortalizas ultracongeladas, en los que la temperatura fluctuará, dependiendo de la tecnología aplicada (congeladores de aire forzado o criogénicos) y su diseño, en ciclos de temperaturas bajas y más elevadas. Los ciclos de temperaturas de entre -30 y -40 °C van seguidos de ciclos breves de desescarche a aproximadamente 30 o 50 °C para evitar el exceso de hielo en el túnel. En caso de que los productos alimenticios permanezcan o se acumulen dentro del túnel, pueden convertirse en un foco de *Listeria monocytogenes*. Así pues, los túneles de congelación deben someterse a un mantenimiento técnico periódico (punto 2.6), un seguimiento adecuado y un control de la temperatura de los ciclos (este punto), así como incluirse en el plan de limpieza y desinfección (punto 2.1) y ser objeto de controles visuales periódicos para evitar una acumulación excesiva de productos como parte de la metodología de trabajo (punto 2.9), con el fin de evitar la acumulación de *Listeria monocytogenes* o la formación de biopelículas en el túnel.

Cabe diferenciar entre dos tipos de desescarche de los túneles:

1. **Desescarche completo del túnel.** Depende del tipo y la capacidad de congelación del túnel. Es preciso hacer una limpieza en profundidad durante cada desescarche completo (véase el punto 2.1).
2. **Desescarche parcial o secuencial durante la producción.** Solo es posible en determinadas marcas de túneles de congelación y se incluye como opción adicional. Los evaporadores nunca se desescarchan todos al mismo tiempo durante la producción. Las secciones de los evaporadores en proceso de

desescarche se cierran completamente y se pasteurizan con gas o agua caliente o vapor. Durante el ciclo de desescarche de la sección de un evaporador, el flujo de aire se desvía a otros grupos de evaporadores que están en modo de congelación.

Sistema de calefacción, ventilación y aire acondicionado (HVAC)

En las plantas transformadoras de ultracongelación puede producirse un gradiente de temperatura y humedad debido a la existencia de zonas a altas temperaturas (ambiente), zonas a bajas temperaturas y el aire que circula entre ellas. Es habitual que se den gradientes de temperatura en las zonas situadas entre la salida de los túneles de congelación y la recogida de las hortalizas ultracongeladas intermedias en grandes bolsas o recipientes (a granel), o en las zonas situadas entre el escaldado y la refrigeración del producto escaldado. El gradiente de temperatura puede provocar condensación y goteo de agua. Un sistema de calefacción, ventilación y aire acondicionado (HVAC) instalado y mantenido profesionalmente constituye un PPR en este tipo de plantas.

2.4. Personal: concienciación, formación y comportamiento

La higiene personal es importante en la prevención y el control de la *L. monocytogenes*, principalmente el comportamiento correcto de los operadores y su concienciación del peligro sobre el patógeno. Por consiguiente, la formación y la comunicación (reiteradas) (p. ej., sobre los resultados de las inspecciones de higiene y del control de la limpieza y desinfección) para aumentar la concienciación son pertinentes. Un factor importante asociado al personal es la posible fuente de contaminación cruzada que suponen el calzado, las manos y los guantes y batas (o uniformes) al pasar de una zona de producción a otra. Pasar de una zona con un régimen de «menor nivel de higiene» a una con un régimen de «mayor nivel de higiene» es crucial en la propagación potencial de la *Listeria monocytogenes* como patógeno ambiental. Por ello, deben establecerse y comunicarse a los operadores instrucciones claras acerca de cómo pasar de un régimen a otro en una zona de producción. Finalmente, pueden incorporarse zonas de higiene intermedias, como una estación de higiene, dispositivos de limpieza del calzado, botas específicas para una zona concreta y puntos de desinfección de manos, con el fin de facilitar el paso entre zonas e impedir que la *Listeria monocytogenes* migre de una zona a otra (véase también el punto 2.5). Estas instalaciones deben incluirse en el programa de limpieza y desinfección, como es el caso de los limpiadores de suelas, para evitar la formación de nichos. Las batas o uniformes han de diferenciarse según la actividad que lleve a cabo el personal (p. ej., producción en una zona con un régimen de menor nivel de higiene, en zonas con un régimen de mayor nivel y mantenimiento técnico). En caso de que en las instalaciones de producción y comercialización trabaje personal temporal, debe proporcionarse formación específica y elaborarse acuerdos sobre lo que se debe y no se debe hacer. Se aconseja, como buena práctica, considerar minimizar el personal temporal en las actividades más críticas de cara al control de la *Listeria monocytogenes*.

2.5. Infraestructura, equipos y dispositivos

La infraestructura y la organización de las instalaciones de producción y almacenamiento serán de vital importancia en la prevención y el control de la *Listeria monocytogenes* durante la producción de hortalizas ultracongeladas.

Zonificación

Es aconsejable diferenciar entre zonas con un régimen de «bajo nivel de higiene» y zonas con un régimen de «alto nivel de higiene». Todas las instalaciones de producción y almacenamiento deben organizarse de este modo. Estas distintas zonas se indican también en los diagramas de flujo (véanse los gráficos 2 a 4). Pueden establecerse distintas zonas:

Zona 1: zona con régimen de bajo nivel de higiene

→ Características:

- Zonas conectadas directamente con el exterior
- Zonas externas de recepción de materias primas
- Fases de producción previas al lavado o escaldado

- Zonas técnicas

→ Medidas de control:

- La presencia de madera, cartón o tierra es posible
- No es necesario acceder a través de estaciones de higiene
- Temperatura, ventilación y flujo del aire no controlados

Zona 2: zona con régimen de alto nivel de higiene

→ Características:

- Sin contacto directo con el exterior
- Fases de producción desde el lavado y el escaldado hasta la ultracongelación de las hortalizas
- Manipulación de productos ultracongelados descubiertos, por ejemplo, durante el glaseado, el mezclado o el embalaje

→ Medidas de control:

- Es necesario acceder a través de estaciones de higiene (= acceso controlado al exterior)
- Ventilación / flujo de aire controlados
- Es aconsejable controlar la temperatura
- Control y presencia de madera o cartones limpios (p. ej., contenedores de cartón octogonales)

Zona 3: zona segura

→ Características:

- Almacenamiento de productos finales o a granel envasados (ultracongelados)
- Temperaturas de congelación del producto

→ Medidas de control:

- Solo embalajes/recipientes cerrados
- Control de la temperatura (temperatura de congelación)

En relación con la separación de las zonas de las instalaciones de producción y almacenamiento, será necesario un régimen de higiene distinto por zona, con medidas de control como las siguientes:

- mayor frecuencia de las actividades de limpieza y desinfección
- mayores restricciones de higiene personal para los operadores
- uso específico de los materiales para la producción (dispositivos móviles seguros, como contenedores y cubos de basura) y de los materiales para la limpieza y la desinfección en una zona determinada
- prevención de contaminaciones cruzadas entre zonas con distinto régimen de higiene: reflexión sobre la organización de las conexiones entre las zonas de higiene para los operadores, materiales, productos alimenticios, equipos y dispositivos (móviles), flujos de aire y agua → paso de «áreas seguras» y zonas con un régimen de «alto nivel de higiene» a zonas con un régimen de «bajo nivel de higiene», y NO a la inversa.

Materiales en contacto con alimentos y diseño higiénico de los equipos, dispositivos e infraestructuras en general

Los materiales en contacto con los alimentos y aquellos equipos e infraestructuras que no estén en contacto directo con los alimentos deben estar contruidos con materiales apropiados (como acero inoxidable o materiales plásticos autorizados para entrar en contacto con los alimentos) que permitan una utilización sostenible, no estén fabricados con materiales porosos o absorbentes y no sean sensibles a la corrosión, con el fin de evitar la creación de nichos. En esos nichos (tales como pequeñas incisiones o grietas), la *L. monocytogenes* puede acumularse y hacer que la parte afectada se convierta en un foco del patógeno. Durante el diseño de las infraestructuras y la planta, debe prestarse atención a su diseño higiénico: por ejemplo, optar por las superficies lisas, evitar uniones abruptas, evitar extremos ciegos en las tuberías, evitar las interconexiones entre el transporte de los productos alimenticios, procurar que los equipos y dispositivos estén suficientemente elevados del suelo para facilitar el saneamiento y evitar salpicaduras del suelo, optar por equipos fáciles de limpiar (tras desmontarlos). Los sistemas de cableado y de tuberías son sensibles a la acumulación de polvo y, en combinación con condiciones de elevada humedad, pueden formarse nichos de

patógenos ambientales sobre ellos o en torno a ellos. Es preciso asegurarse de que las estructuras de pasarelas y las escaleras de rejilla no estén situadas sobre alimentos expuestos o agua. Las superficies que no estén en contacto con alimentos deben incluirse en las actividades periódicas de limpieza y desinfección (véase el punto 2.1) y, en la medida de lo posible, deben evitarse las construcciones horizontales.

Flujo de aire / sistemas de ventilación

Es aconsejable controlar el **flujo de aire** entre zonas con un régimen de alto nivel de higiene y aquellas con un régimen de bajo nivel de higiene: el aire debe fluir de las zonas limpias a las sucias, por lo que se considera un flujo positivo de aire, de un régimen de alto nivel de higiene a uno de bajo nivel de higiene. Los sistemas de ventilación, incluidos los evaporadores de los túneles de congelación, deben someterse a mantenimiento y limpiarse conforme a sus necesidades. Debe valorarse sin son necesarios filtros para purificar el aire. La **fuentes del aire** de entrada puede ser una fuente potencial de contaminación, por lo que los EEA deben comprobar de dónde procede el aire (p. ej., evitar la admisión de zonas técnicas o sucias, como las zonas de eliminación de residuos). En caso de emplearse **aire comprimido** (p. ej., para la separación óptica), es necesario usar filtros para evitar que se viertan gotículas de aceite de los sistemas de bombeo y que circulen microorganismos. Los filtros deben incluirse en el programa de mantenimiento periódico (véase el punto 2.6) para evitar la formación de nichos de *L. monocytogenes*.

Equipos móviles

Algunos componentes de los equipos están diseñados para ser móviles y pueden insertarse o retirarse de las líneas de transformación según el tipo de producto (p. ej., verdura de hoja frente a tubérculo), el grado de suciedad de las materias primas (p. ej., presencia de tierra o arena), la necesidad de una clasificación adicional o de eliminación de insectos, los dispositivos de corte (p. ej., tiras frente a rodajas), etc. En caso de insertar componentes de los equipos o trasladarlos a otra zona de la fábrica, debe evaluarse su estado de limpieza y potencial de contaminación cruzada (p. ej., si se atraviesan zonas de alto y bajo nivel de higiene, si circulan personas, materiales) y es preciso realizar un examen antes de la entrada en funcionamiento. Los dispositivos (de control) más reducidos (p. ej., termómetros o medidores del ATP) que circulen por las instalaciones pueden provocar una contaminación cruzada y deben manipularse de forma específica, por ejemplo, no trasladarse de un régimen de bajo nivel de higiene a uno de alto nivel de higiene o, como recomendación de buena práctica, deben reservarse para una zona concreta de la fábrica.

2.6. Mantenimiento técnico

El mantenimiento técnico preventivo, entendido como revisión planificada y examen de los equipos e infraestructuras, tiene una importancia crucial en la prevención y el control de la *L. monocytogenes*. Los EEA deben implantar un plan de mantenimiento preventivo que incluya lo siguiente:

- una descripción detallada del tipo de mantenimiento técnico
- una planificación en función de las actividades de producción (no debe organizarse ningún tipo de mantenimiento técnico durante las actividades de producción para evitar la contaminación de productos)
- la necesidad de un examen antes de la entrada en funcionamiento de máquinas y equipos que no se usen frecuentemente (es decir, en caso de producción estacional)
- todas las máquinas y equipos, incluidas también las instalaciones de grandes dimensiones (sistemas de tuberías de aguas y de bombeo, túneles de congelación, etc.), en contacto directo o indirecto con los productos alimenticios deben incluirse en el plan de mantenimiento
- la sustitución de los filtros de aire y agua y el control de biopelículas en dichos filtros
- los equipos de gestión del agua y los sistemas de eliminación de efluentes
- la organización de una limpieza previa a la puesta en marcha tras las intervenciones técnicas
- uniformes y calzado específicos para los técnicos internos y externos para las distintas zonas de la planta
- equipos de mantenimiento específicos y carros o equipos móviles con utensilios para los técnicos restringidos a las distintas zonas y regímenes de higiene de la planta de producción.

Deben organizarse inspecciones periódicas de higiene (p. ej., tres o cuatro veces al año) para detectar puntos de contaminación adicionales, tales como grietas, incisiones o corrosión que requieran una intervención técnica.

2.7. Control de los residuos

Los residuos alimentarios tienen distintas gradaciones y, mientras los flujos de alimentos formen parte de la cadena alimentaria humana o animal, deben respetarse el régimen y las restricciones de higiene y seguridad adecuados. A lo largo del conjunto de las actividades de producción y almacenamiento, se han de evitar las contaminaciones cruzadas entre «alimentos» y «residuos». El EEA debe determinar qué hacer en caso de que haya productos alimenticios en el suelo (p. ej., en caso de que las cintas transportadoras estén sobrecargadas y algunos productos caigan al suelo) para evitar la contaminación cruzada de los alimentos por *L. monocytogenes* presente en desagües o en el suelo. Se recomienda encarecidamente que dichos productos se destinen a la producción de piensos y dejen de utilizarse como «alimentos», a menos que se encuentren justo al comienzo del proceso de producción, en el que los productos del campo entran en las instalaciones de producción (en una zona con un régimen de bajo nivel de higiene).

Los cubos de basura, los contenedores de residuos y los sistemas de recogida rodantes deben estar en buenas condiciones (véanse los puntos 2.5 y 2.6) e incluirse dentro del plan de limpieza y desinfección (véase el punto 2.1). Están incluidos asimismo en los requisitos de los operadores en el marco de la metodología de trabajo para evitar que los cubos de basura crucen distintas zonas y de este modo propaguen la *L. monocytogenes* por el entorno de producción (véase el punto 2.9). Los contenedores deben destinarse a una función específica (p. ej., producto aceptado, reelaboración, retirada de piensos, residuos) y distinguirse claramente unos de otros (p. ej., mediante un código de colores, etiquetas, marcas).

2.8. Control de materias primas y selección de proveedores

Minimizar la probabilidad de que las materias primas (como las hortalizas del campo), los productos semielaborados (como las hortalizas previamente limpiadas y lavadas) y los ingredientes (como el arroz precocinado, los productos cárnicos o a base de pescado, las especias, etc.) se contaminen en el momento en que se entregan es una medida preventiva para reducir la presencia de *Listeria monocytogenes* en la producción de hortalizas ultracongeladas.

Dependiendo de la naturaleza de los productos entrantes, pueden darse diversos tipos de contaminación:

- **Materias primas procedentes del campo, como las hortalizas crudas**, pueden contener *L. monocytogenes* al llegar a la fábrica → la presencia de tierra y los contenedores usados para el transporte pueden ser factores de riesgo de contaminación. En caso de que los productos se refrigieren en el campo o la explotación agraria, puede producirse una contaminación relacionada con la humedad (p. ej., aplicación de agua de refrigeración, pulverización de gotículas de agua fría para reducir la temperatura de los productos).
- **Productos semielaborados (p. ej., materias primas previamente limpiadas que están lavadas, peladas o troceadas, como las zanahorias y las cebollas)** → estos productos proceden de otras instalaciones de transformación y pueden contaminarse durante su transformación o ser objeto de contaminación cruzada por los contenedores en los que se transportan. Una temperatura inadecuada puede estimular la proliferación de *L. monocytogenes*.
- **Ingredientes** (p. ej., hortalizas ultracongeladas, pescado, carne, arroz, productos deshidratados, etc.) → pueden haber sido contaminados por el proveedor y se incorporan al proceso de producción del EEA.
- **Materiales de embalaje** (p. ej., materias primas, material usado durante el almacenamiento, como bolsas grandes, contenedores para material a granel) → son menos sensibles a la contaminación por *Listeria monocytogenes*, pero deben estar limpios, no tener polvo y protegerse de la contaminación cruzada cuando se reciban.
- **Coadyuvantes tecnológicos** (p. ej., agentes desinfectantes del agua, agentes antiespumantes aplicados en tanques de lavado, etc.) o aditivos → son menos sensibles a la contaminación por *L.*

monocytogenes, pero deben almacenarse y distribuirse en depósitos y recipientes limpios para evitar la contaminación cruzada del entorno de la fábrica.

- **Agua** → véase el punto 2.2.

La selección de los proveedores y la notificación a estos de la presencia de *L. monocytogenes* relacionada con una materia prima en particular es una fase importante para evitar una posible contaminación. No obstante, debido a la naturaleza de las distintas materias primas, será imposible tener materias primas «libres de *Listeria*», pues la mayoría de las que se utilizan en este sector no son objeto de medidas de control listericida durante su producción o proceso de elaboración (como la pasteurización o la esterilización). Por consiguiente, es preciso llevar a cabo una selección de los proveedores exhaustiva que incluya las siguientes medidas de control:

- desarrollar procedimientos para la selección y aprobación de los proveedores;
- entablar relaciones (a largo plazo) con los proveedores;
- realizar auditorías periódicas *in situ* para asegurarse de que los proveedores disponen de un SGSA sólido y aplican buenas prácticas y normas generales de higiene para evitar la contaminación por *L. monocytogenes*;
- considerar proveedores de la UE y de terceros países (en estos últimos puede haber otra legislación en vigor).

En el caso de las hortalizas crudas procedentes del campo, cabe esperar contaminación ambiental por *Listeria* spp. o, en último término, por *L. monocytogenes*. No obstante, estos proveedores (producción primaria) deben controlar la posible contaminación adicional evitando el uso de contenedores, cajas o recipientes sucios, materiales y equipos de recolección sucios y fuentes de agua contaminada, y deben evitar asimismo que se formen biopelículas en zonas de humidificación y de almacenamiento refrigerado, cuando proceda. Todas estas medidas deben formar parte de sus buenas prácticas agrícolas y centrarse en la minimización de la contaminación microbiológica en la producción primaria. Se aconseja a los productores agrícolas que trabajen de conformidad con el documento «Nota de la Comisión sobre la Guía para combatir los riesgos microbiológicos en frutas y hortalizas frescas en la producción primaria mediante una buena higiene» (Nota de la Comisión C163/2017), en el que se exponen una serie de buenas prácticas agrícolas y de higiene con el fin de evitar o minimizar la contaminación microbiológica en las explotaciones agrarias y durante las primeras actividades tras la recolección.

Realizar una prueba en un único lote de materias primas para detectar la presencia de *L. monocytogenes* (= muestreo por lotes) tiene un valor limitado a la hora de determinar la aceptabilidad de ese lote y no puede sustituir a otros PPR y al APPCC para controlar la presencia de *Listeria monocytogenes* en el proceso de producción del EEA (véanse más detalles en el punto 5.1). El valor principal de las pruebas en materias primas forma parte de la compilación de un historial y permite hacer un seguimiento de los proveedores como parte de la evaluación y verificación de estos. Por lo tanto, la realización de pruebas en materias primas y el control por lotes NO constituyen una medida de control adecuada de la *L. monocytogenes*.

2.9. Metodología de trabajo

Por último, la metodología de trabajo, la organización del proceso de producción y el sistema de gestión implantados en las instalaciones revestirán la máxima importancia en la prevención y el control diarios de la propagación de *Listeria monocytogenes* y la posible formación de biopelículas y nichos en el entorno de producción. Los siguientes aspectos merecen una atención especial por lo que respecta a la prevención y el control de la *L. monocytogenes*:

Pulcritud

La fábrica y la zona circundante deben estar limpias y en orden. Los productos que se acumulen a lo largo de la línea de transformación (p. ej., cintas transportadoras, túnel de congelación) pueden retirarse de inmediato y no es necesario que se acumulen hasta efectuar la limpieza y desinfección periódicas. Es importante seguir el principio de «limpieza visual sobre la marcha», retirando con frecuencia el material de los aparatos transportadores, los equipos de transformación, el suelo, etc., pues de este modo se reducirá la carga general

de las instalaciones.

Compromiso y concienciación de la dirección y el personal

La dirección de la planta debe establecer **puestos clave para el personal** en las distintas zonas con objeto de aplicar y controlar a diario los requisitos previos, PPRO y PCC necesarios (véase la sección 3, basada en el plan de APPCC). Todo el personal (incluidos los técnicos y el personal temporal) debe **estar concienciado y formado** en relación con el control de la *Listeria monocytogenes* (como se establece en el punto 2.4). La dirección debe **asignar recursos** (es decir, dinero, tiempo,

personal, conocimientos especializados) para el muestreo ambiental, las inversiones en infraestructuras y mantenimiento, el tratamiento del agua, etc., que son necesarios para prevenir y controlar la *Listeria monocytogenes*.

Organización del proceso de producción de hortalizas ultracongeladas

La producción de hortalizas ultracongeladas depende enormemente de la disponibilidad estacional de las materias primas. Los picos de producción coinciden con la temporada de recolección de los productos transformados. La planta debe estar organizada para ello por lo que respecta a:

- la disponibilidad de dispositivos y equipos (para tener todos los equipos y líneas de transformación necesarios preparados e instalados),
- el tiempo asignado a los puntos de interrupción de la producción para las actividades de limpieza y desinfección (véase el punto 2.1),
- la disponibilidad de personal,
- la disponibilidad de agua,
- etc.

Es posible que se opere con varias líneas de transformación y varios productos al mismo tiempo, lo que puede contribuir a una mayor probabilidad de contaminación cruzada entre líneas, personal y productos. Se recomienda que la producción esté bien organizada para reducir al mínimo la circulación de personal y dispositivos entre las distintas zonas y líneas. Deben realizarse interrupciones intermedias en las líneas de producción en continuo funcionamiento para poder llevar a cabo actividades de limpieza y saneamiento intermedias, el vaciado con aire del túnel de congelación para retirar los productos acumulados, los productos residuales, etc.

El proceso de producción es mayoritariamente un proceso continuo, que comienza con las materias primas y finaliza con los productos ultracongelados a granel. El **principio de avance** de los productos no suele suponer un problema. Sin embargo, es preciso controlar la circulación de dispositivos rodantes, personal y equipos móviles, especialmente cuando pasan de zonas con régimen de bajo nivel de higiene a zonas con régimen de alto nivel de higiene.

Todas las fases del proceso de producción han de contar con sus propias instrucciones para el personal sobre lo que se debe y no se debe hacer por lo que respecta a las actividades de producción, las normas de higiene, las medidas de seguridad de los alimentos, los controles de calidad que deben efectuarse, etc. Por tanto, debe implantarse un **sistema de documentación** adecuado con instrucciones y procedimientos fáciles de comprender y de consultar.

3. APPCC (plan de análisis de peligros y puntos de control crítico)

No solo los PPR, sino también el plan de APPCC de las plantas de producción y almacenamiento de hortalizas ultracongeladas deben tener en cuenta la *L. monocytogenes* para detectar en qué parte del proceso es factible que aparezca, se acumule, aumente o se reduzca el peligro. Para el plan de APPCC, se sigue la estructura y metodología de la Comunicación de la Comisión sobre la gestión de la seguridad alimentaria (C278/2016). En los gráficos 2, 3 y 4 se muestra un diagrama de flujo que describe las distintas fases del proceso.

Observación 1: El presente plan de APPCC puede utilizarse como punto de partida para el plan de APPCC de una empresa o para revisar el plan actual. Es importante ajustarlo al plan específico de la empresa adaptando las fases de producción, los equipos específicos, la información sobre la validación y las mediciones de las líneas de producción, etc.

Observación 2: Se hace hincapié en la detección de peligros, las medidas preventivas, la evaluación de peligros ($P \times E = R$) y también en definir posibles PCC, PPRO o PPR y en el peligro *Listeria monocytogenes*. Las demás partes del plan de APPCC (a saber, la validación, la verificación y la documentación) no se desarrollan

en la presente guía. Asimismo, tampoco se incluyen otros peligros (es decir, otros peligros microbiológicos, químicos y físicos) y el EEA deberá analizarlos en mayor profundidad. Por tanto, puede seguirse la Comunicación de la Comisión sobre la gestión de la seguridad alimentaria (C278/2016).

Observación 3: Las presentes directrices se refieren a las hortalizas congeladas que no se consideran listas para el consumo (NLPC). Los explotadores de empresas alimentarias (EEA) que se propongan comercializar hortalizas congeladas listas para el consumo (LPC) deben seguir medidas de prevención y control adicionales para garantizar la seguridad de los productos LPC, si bien estas no se incluyen en el plan de APPCC aquí expuesto.

En la tabla 2, se enumeran los peligros por cada fase del proceso, se añaden las medidas de control establecidas, se calculan la probabilidad (P) y el efecto (E) para la salud humana, y se atribuye el riesgo (R). Por último, en función del nivel de riesgo atribuido, se asigna un PPR, un PPRO o un PCC. En la tabla 3 se muestran ejemplos de cuadros de vigilancia, en los que se insertan las medidas de vigilancia y correctivas que han de adoptarse.

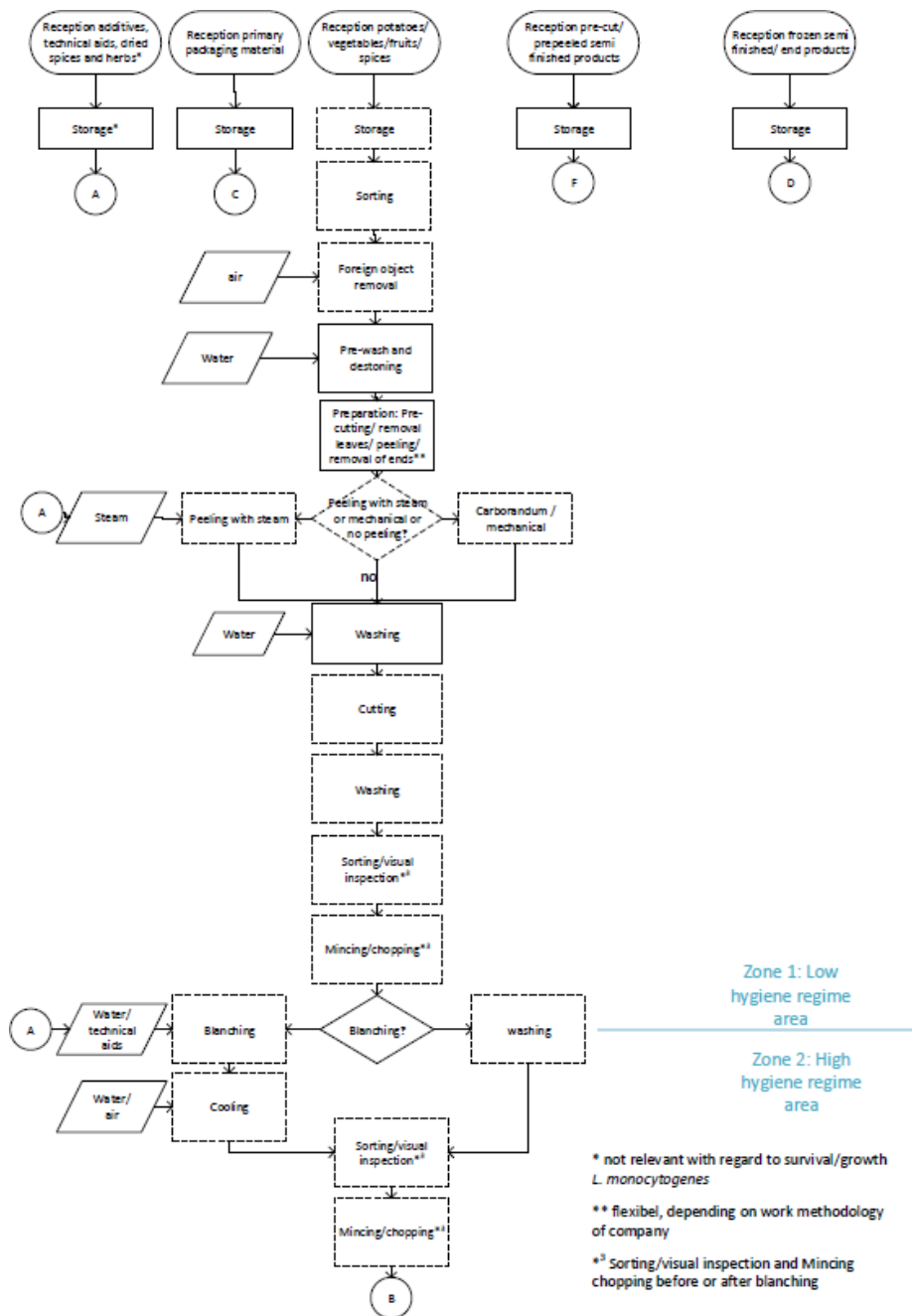


Gráfico 2. Diagrama de flujo de la producción de hortalizas ultracongeladas, parte 1

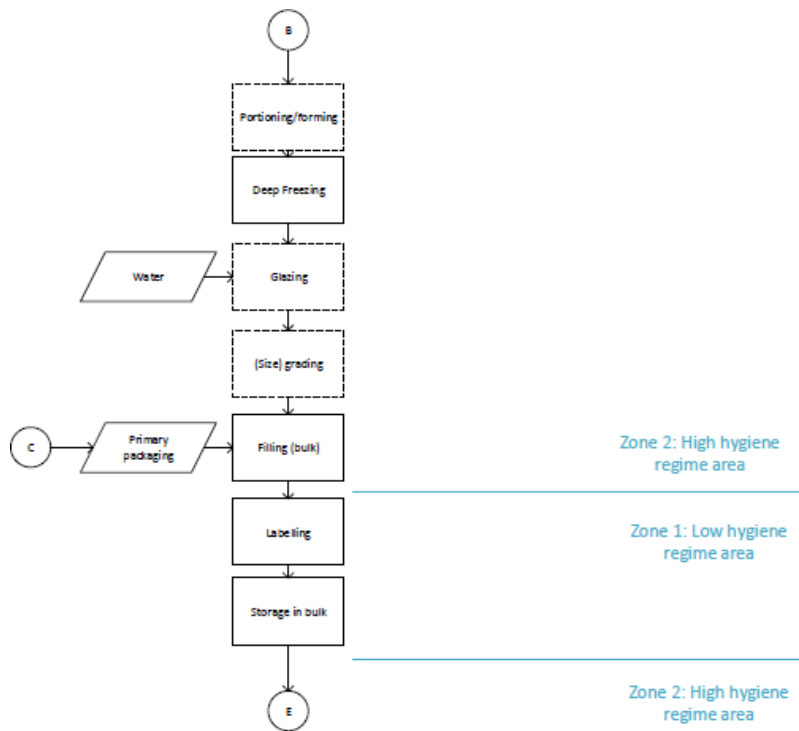


Gráfico 3. Diagrama de flujo de la producción de hortalizas ultracongeladas, parte 2

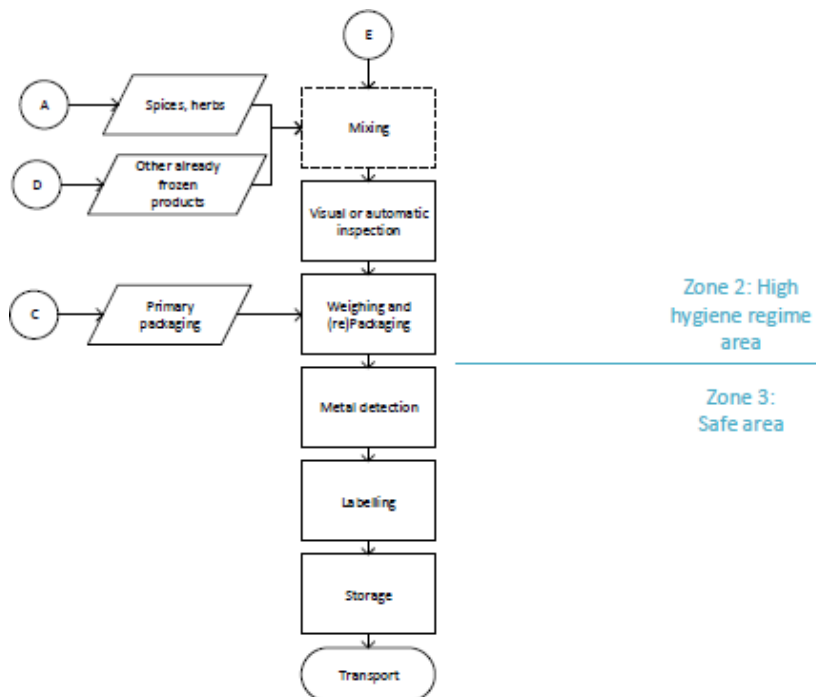


Gráfico 4. Diagrama de flujo de la producción de hortalizas ultracongeladas, parte 3

Tabla 2: Determinación de peligros, medidas de prevención/control, probabilidad (P), efecto (E), riesgo (R) y atribución de PPR, PPRO o PCC						
Determinación de los peligros	Medida de prevención/control	P	E	R	Justificación	PPR/PPRO/PCC
Recepción y almacenamiento de materias primas, productos semielaborados, ingredientes ultracongelados y agua (zona 1: zona con régimen de bajo nivel de higiene), gráf. 2						
<i>L. monocytogenes</i> presente en materias primas procedentes de la producción primaria (el campo) (hortalizas)	Selección de proveedores / política de compra: <ul style="list-style-type: none"> • Buenas prácticas agrícolas • Limpieza y desinfección de equipos/recipientes • Control de biopelículas en caso de almacenamiento refrigerado / humidificación de productos 	1	3	3		PPR de materias primas (punto 2.8)
<i>L. monocytogenes</i> presente en productos semielaborados (hortalizas previamente limpiadas) e ingredientes (productos ultracongelados)	Selección de proveedores / política de compra: <ul style="list-style-type: none"> • Buenas prácticas de higiene y APPCC • Plan de control de la <i>Listeria monocytogenes</i> elaborado e implantado con el proveedor • Recipientes limpios a su llegada • Temperatura de refrigeración adecuada a su llegada 	2	3	4		PPR de materias primas (punto 2.8) PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9): control de entrada a la llegada
Agua contaminada por <i>L. monocytogenes</i>	Selección de fuentes de agua adecuadas, controles periódicos de la calidad del agua	1	3	3		PPR del agua (punto 2.2)

<p>Contaminación por <i>L. monocytogenes</i> procedente de zonas de recepción y almacenamiento</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la temperatura en caso de almacenamiento refrigerado o ultracongelado • Control del tiempo y principio FIFO («primero en entrar, primero en salir») para los productos (refrigerados) • Limpieza y desinfección de las zonas de almacenamiento/equipo • Mantenimiento técnico de las zonas de almacenamiento 	<p>2</p>	<p>3</p>	<p>4</p>		<p>PPR del control de la temperatura (punto 2.3) PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9) PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de infraestructuras (punto 2.5)</p>
<p>Aditivos, coadyuvantes tecnológicos, hierbas culinarias y especias secas, materiales de embalaje → fuentes no pertinentes para la <i>L. monocytogenes</i></p>						

Clasificación, retirada de objetos extraños, prelavado/deshuesado, preparación, fases de lavado, cortado, clasificación / inspección visual, pelado, picado y troceado (zona 1: zona con régimen de bajo nivel de higiene), gráf. 2						
Contaminación por medio del entorno de producción, equipos, utensilios	<ul style="list-style-type: none"> Programa de limpieza y desinfección Mantenimiento técnico, incluidos controles antes de la entrada en funcionamiento en caso de uso estacional de dispositivos/equipos Infraestructura 	1	3	3	Pueden formarse biopelículas dentro de los equipos o sobre ellos; P = 1: zona 1	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de mantenimiento técnico (punto 2.6) PPR de infraestructuras (punto 2.5)
Contaminación a través de operadores	<ul style="list-style-type: none"> Formación y concienciación del personal Infraestructura: estaciones de higiene entre zonas distintas 	1	3	3	P = 1, todavía en zona con régimen de bajo nivel de higiene	PPR del personal (punto 2.3) PPR de infraestructuras (punto 2.5)
Aire contaminado usado para retirar objetos extraños o en tanques de lavado para crear sistemas de lavado de tipo «jacuzzi»	<ul style="list-style-type: none"> Filtros adecuados y limpieza de filtros y evaporadores Control de la procedencia del aire 	1	3	3	P = 1, todavía en zona con régimen de bajo nivel de higiene	PPR de infraestructuras: control del aire (punto 2.5)
Agua contaminada y formación de biopelículas en tanques de lavado (para las fases de lavado)	<p>Gestión del agua:</p> <ul style="list-style-type: none"> Limpieza y desinfección del sistema de tuberías y el tanque de lavado (y otros equipos de lavado como paletas y tambores giratorios) Renovación frecuente del agua o rellenado de los depósitos de agua Reciclado o tratamiento del agua cuando sea necesario 	1	3	3	P = 1, todavía en zona con régimen de bajo nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de gestión del agua (punto 2.2)
		2*	3	4	*P = 2, en el caso de productos no escaldados (p. ej., puerros, cebollas)	PPRO 1: contaminación del agua de tanques de lavado en el caso de productos no escaldados

Uso de agua contaminada para la preparación con vapor, en caso de pelado a vapor	Tratamiento adecuado del agua para evitar la contaminación	1	3	3	P = 1, todavía en zona con régimen de bajo nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de gestión del agua (punto 2.2)
--	--	---	---	---	---	---

<p>Escaldado (zonas 1 y 2), gráf. 2</p> <p>Observaciones: en el caso de las hortalizas no sometidas al proceso de escaldado, esta fase de la producción consistirá en una fase de lavado adicional, ya que los productos siguen las mismas líneas de transformación.</p>	<p>El escaldado es un tratamiento térmico y un paso tecnológico cuyo objetivo es inactivar las enzimas para estabilizar las hortalizas ultracongeladas durante un almacenamiento prolongado en condiciones de congelación. Algunos productos se escaldan mientras que otros no; esto depende en gran medida de las decisiones del EEA, los requisitos de los clientes, etc.</p> <p>El escaldado se lleva a cabo principalmente sumergiendo los productos en agua caliente o vapor. Las temperaturas pueden oscilar entre 65 y 110 °C y se mantienen durante un tiempo determinado (entre 1 y 10 minutos, dependiendo del producto, el tamaño de los trozos de hortalizas, la variabilidad estacional, etc.) → las combinaciones de tiempo/temperatura dependen del tiempo necesario para inactivar las enzimas polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD). Algunos productos no pueden escaldarse por los efectos perjudiciales para la calidad del producto (p. ej., las cebollas o el puerro).</p> <p>a: El escaldado tendrá un efecto reductor en la flora microbiana (hoy en día también conocida como «microbiota») de las hortalizas, si bien su objetivo no es eliminar patógenos como la <i>L. monocytogenes</i> ni reducirlos a una cantidad aceptable, conforme a las definiciones de un PCC del APPCC. Por consiguiente, el escaldado NO se considera un PCC en la eliminación de la <i>Listeria monocytogenes</i> ni una pasteurización completa (esto es, una reducción logarítmica de 6 de la <i>L. monocytogenes</i>).</p>					
<p>Tiempo de escaldado demasiado breve o temperatura demasiado baja, de modo que la <i>Listeria monocytogenes</i> puede proliferar en el agua o el producto</p>	<ul style="list-style-type: none"> Control del tiempo y la temperatura de la fase de escaldado Verificación de la destrucción de enzimas por medio de pruebas enzimáticas 	2	3	4	Véase a	PPRO 2: proceso de escaldado, tiempo/temperatura
<p>Contaminación a través del entorno de producción, equipos, utensilios</p>	<ul style="list-style-type: none"> Programa de limpieza y desinfección Mantenimiento técnico Infraestructura 	2	3	4	P = 2, debido al paso a una zona con régimen de alto nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de mantenimiento técnico (punto 2.6) PPR de infraestructuras (punto 2.5)
<p>Contaminación a través de operadores</p>	<ul style="list-style-type: none"> Formación y concienciación del personal Infraestructura: estaciones de higiene entre zonas distintas 	2	3	4	P = 2, debido al paso a una zona con régimen de alto nivel de higiene	PPR del personal (punto 2.3) PPR de infraestructuras (punto 2.5)
<p>Uso de agua/vapor contaminados; reciclaje de agua</p>	<ul style="list-style-type: none"> Limpieza y desinfección del sistema de tuberías Decisión sobre el reciclaje de agua en las fases de escaldado Seguimiento de la contaminación potencial del agua y la 	2	3	4	P = 2, debido al paso a una zona con régimen de alto nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de gestión del agua (punto 2.2)

	necesidad de desinfectarla					
Refrigeración (zona 2: régimen de alto nivel de higiene), gráf. 2						
Proliferación de la <i>L. monocytogenes</i> cuando la refrigeración es demasiado lenta (en caso de supervivencia tras el escaldado o de contaminación posterior al escaldado)	<ul style="list-style-type: none"> Control del tiempo/ temperatura de refrigeración Respeto de la capacidad de refrigeración: volumen de productos que pueden pasar por la fase de refrigeración Investigación de la necesidad de desinfectar el agua para evitar la acumulación de crecimiento bacteriano en el agua de refrigeración 	2	3	4	Véase 6	PPRO 3: seguimiento de la temperatura del agua de refrigeración
Contaminación a través del entorno de producción, equipos, utensilios	<ul style="list-style-type: none"> Programa de limpieza y desinfección Mantenimiento técnico Infraestructura 	2	3	4	P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de mantenimiento técnico (punto 2.6) PPR de infraestructuras (punto 2.5)
Contaminación a través de operadores	<ul style="list-style-type: none"> Formación y concienciación del personal Infraestructura: estaciones de higiene entre zonas distintas 	2	3	4	P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene	PPR del personal (punto 2.3) PPR de infraestructuras (punto 2.5)

<p>Contaminación cruzada a través del agua contaminada</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Limpieza y desinfección del sistema de tuberías de agua • Evaluación de la necesidad de añadir desinfectante como coadyuvante tecnológico para mantener la calidad del agua • Evaluación del volumen de agua añadida a los tanques de refrigeración para renovar el agua de refrigeración 	<p>2</p>	<p>3</p>	<p>4</p>	<p>P=2, por ser una zona 2</p>	<p>PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de gestión del agua (punto 2.2)</p>
<p>Normalmente se debe reducir la temperatura del producto por debajo de los 10 °C en un minuto, dos como máximo (EFSA, 2018b). Se ha de evitar mantener en un rango de temperatura de entre 50 y 10 °C.</p>						
<p>Clasificación/inspección visual, picado/troceado, división/moldeado, clasificación según el tamaño tras la congelación (zona 2: régimen de alto nivel de higiene), gráf. 2/3</p>						
<p>Contaminación a través del entorno de producción, equipos, utensilios y productos alimenticios descartados tras la clasificación óptica/visual para tratarlos como residuos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Programa de limpieza y desinfección • Mantenimiento técnico • Infraestructura 	<p>2</p>	<p>3</p>	<p>4</p>	<p>P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene</p>	<p>PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de mantenimiento técnico (punto 2.6) PPR de infraestructuras (punto 2.5) PPR de residuos (punto 2.7)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Recogida correcta de los residuos o retirada de los productos descartados 					
<p>Contaminación a través de operadores</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Formación y concienciación del personal • Infraestructura: estaciones de higiene entre zonas distintas 	<p>2</p>	<p>3</p>	<p>4</p>	<p>P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene</p>	<p>PPR del personal (punto 2.3) PPR de infraestructuras (punto 2.5)</p>

Contaminación cruzada procedente de la zona 1	<p>Metodología de trabajo para evitar la contaminación cruzada:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Utensilios/equipos distintos para cada zona • Cubos de basura para recoger los productos alimenticios descartados 	2	3	4	P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene	PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)
Ultracongelación/glaseado (zona 2: régimen de alto nivel de higiene), gráf. 3						
Congelación demasiado lenta o fluctuaciones de temperatura en el congelador, lo que provoca una proliferación/contaminación de <i>L. monocytogenes</i> , a temperaturas de < -18 °C	<ul style="list-style-type: none"> • Validación y control del tiempo y la temperatura de congelación • Debe definirse el tiempo / la temperatura / los ciclos de congelación para cada grupo de productos (según la naturaleza de las hortalizas, su tamaño, etc.) 	2	3	4	Véase c	PPRO 4: tiempo / temperatura de congelación
Contaminación procedente del interior del túnel de congelación / congelador (p. ej., formación de biopelículas, goteo)	<ul style="list-style-type: none"> • Limpieza y desinfección del túnel de congelación, las cintas transportadoras y las instalaciones • Diseño higiénico (incluido el flujo de aire) 	2	3	4	P = 2, régimen de alto nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de infraestructuras (punto 2.5)
Aire contaminado (p. ej., congelador de aire forzado)	<ul style="list-style-type: none"> • Comprobación del origen del aire • Limpieza y desinfección, filtros adecuados y limpieza de los filtros y evaporadores 	2	3	4	P = 2, régimen de alto nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de infraestructuras (punto 2.5)
Agua contaminada utilizada para el glaseado	<ul style="list-style-type: none"> • Limpieza y desinfección del sistema de tuberías / evaporador / boquilla • Uso de agua de calidad potable 	2	3	4	P = 2, régimen de alto nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de gestión del agua (punto 2.2)
c Dado que la <i>L. monocytogenes</i> no se elimina por completo durante el escaldado y puede producirse una contaminación cruzada, reviste la máxima importancia que esta no proliferen dentro del congelador.						

Llenado a granel (zona 2-1: paso de un régimen de alto nivel de higiene a uno de bajo nivel cuando se cierran los embalajes), gráf. 2						
Material de embalaje contaminado	<ul style="list-style-type: none"> Política de compra Entorno de almacenamiento limpio y seco En caso de materiales reutilizables: correcto saneamiento 	2	3	4	P = 2, régimen de alto nivel de higiene debido al contacto directo del material de embalaje con productos ultracongelados	PPR del control de las materias primas (punto 2.8) PPR de infraestructuras (punto 2.5) PPR de limpieza y desinfección en caso de materiales reutilizables (punto 2.1)
Contaminación a través del entorno de producción, equipos, utensilios → uso de contenedores para graneles que se transportan por las instalaciones y se introducen en un régimen de alto nivel de higiene	<ul style="list-style-type: none"> Programa de limpieza y desinfección Infraestructura Metodología de trabajo para los contenedores para graneles (instrucciones de uso) 	2	3	4	P = 2, zona con régimen de bajo nivel de higiene	PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1) PPR de infraestructuras (punto 2.5) PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)
Contaminación a través de operadores	<ul style="list-style-type: none"> Formación y concienciación del personal Infraestructura: estaciones de higiene entre zonas distintas 	2	3	4	P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene	PPR del personal (punto 2.3) PPR de infraestructuras (punto 2.5)
Posible proliferación de <i>L. monocytogenes</i> en caso de fluctuaciones de la temperatura de los productos, o en caso de interrupción del flujo hacia el almacenamiento en el congelador debido a una falta de seguimiento del control de la temperatura en esa parte de la planta	<ul style="list-style-type: none"> Metodología de trabajo: instrucciones sobre el transporte continuo desde recipientes para productos a granel llenos de hortalizas ultracongeladas al congelador; cierre hermético de los contenedores para graneles En caso de interrupciones del trabajo → deben adoptarse medidas correctivas respecto a los productos (mediciones de T, muestreo de productos para autorizar los lotes) 	2	3	4	P = 2, importante para evitar el crecimiento y la proliferación	PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)

Etiquetado y almacenamiento a granel (zona 3: zona segura), gráf. 2						
Fecha de vida útil de almacenamiento / código del producto incorrectos	<ul style="list-style-type: none"> • Metodología de trabajo: la vida útil de almacenamiento será importante en el marco de la identificación y la trazabilidad 	1	3	3	Las temperaturas son demasiado bajas para la proliferación de <i>L. monocytogenes</i> (ultracongelación)	PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)
Daño y contaminación de productos por <i>L. monocytogenes</i> durante su almacenamiento (p. ej., goteo)	<ul style="list-style-type: none"> • Mantenimiento del almacén en buenas condiciones • Metodología de trabajo: no dejar embalajes en el suelo ni abiertos • Limpieza y desinfección periódicas 	1	3	3	El producto está envasado y ultracongelado (zona 3)	PPR de infraestructuras (punto 2.5) PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9) PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1)
Proliferación de <i>L. monocytogenes</i> en caso de regulación inadecuada de la temperatura	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la temperatura y el tiempo de almacenamiento • Metodología de trabajo: principio FIFO 	2	3	4		PPR del control de la temperatura (punto 2.4) PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)
Mezcla con especias / hierbas culinarias / otros productos ultracongelados e inspección (visual/automática) y repesado/reenvasado (zona 2: régimen de alto nivel de higiene), gráf. 4						
Contaminación durante la apertura de los embalajes a granel	<ul style="list-style-type: none"> • Metodología de trabajo: abrir los embalajes (recipientes para graneles con hortalizas ultracongeladas o recipientes de los proveedores con ingredientes) de forma higiénica para evitar que el polvo o las capas exteriores de los materiales de envasado entren en contacto con las hortalizas ultracongeladas 	2	3	4	P = 2, régimen de alto nivel de higiene y embalajes abiertos	PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)

Material de embalaje contaminado	<ul style="list-style-type: none"> • Política de compra • Entorno de almacenamiento limpio y seco • En caso de materiales reutilizables: correcto saneamiento 	2	3	4	P = 2, régimen de alto nivel de higiene debido al contacto directo del material de embalaje con productos ultracongelados	<p>PPR del control de las materias primas (punto 2.8)</p> <p>PPR de infraestructuras (punto 2.5)</p> <p>PPR de limpieza y desinfección en caso de materiales reutilizables (punto 2.1)</p>
Contaminación a través de operadores	<ul style="list-style-type: none"> • Formación y concienciación del personal 	2	3	4	P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene	<p>PPR del personal (punto 2.3)</p> <p>PPR de infraestructuras (punto 2.5)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Infraestructura: estaciones de higiene entre zonas distintas 					
Contaminación a través del entorno de producción, equipos, utensilios	<ul style="list-style-type: none"> • Programa de limpieza y desinfección • Mantenimiento técnico • Infraestructura 	2	3	4	P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene	<p>PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1)</p> <p>PPR de mantenimiento técnico (punto 2.6)</p> <p>PPR de infraestructuras (punto 2.5)</p>
Tiempo fuera del congelador demasiado prolongado, temperatura del producto demasiado elevada, lo que permite la proliferación de <i>L. monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Control del tiempo y la temperatura en esta zona • Metodología de trabajo: extraer únicamente un número limitado de contenedores del congelador de almacenamiento para evitar un aumento de la temperatura de los productos • En caso de interrupciones en la producción, adoptar medidas correctivas respecto a los productos, como mediciones de temperatura, y decidir qué se ha de hacer con los productos (p. ej., muestreo por lotes y 	2	3	4	P = 2, zona con régimen de alto nivel de higiene	<p>PPR del control de la temperatura (punto 2.4)</p> <p>PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)</p>

	autorización de su distribución)					
Detección de metales / etiquetado / almacenamiento / transporte (zona 3: zona segura de embalajes cerrados), gráf. 4						
Fecha de vida útil de almacenamiento / código del producto incorrectos	Metodología de trabajo: la vida útil de almacenamiento será importante en el marco de la identificación y la trazabilidad	1	3	3	Las temperaturas son demasiado bajas para la proliferación de <i>L. monocytogenes</i> (ultracongelación)	PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)
Daño y contaminación de productos por <i>L. monocytogenes</i> durante su almacenamiento (p. ej., goteo)	<ul style="list-style-type: none"> Mantenimiento de los almacenes y los modos de transporte en buenas condiciones Metodología de trabajo: no dejar embalajes en el suelo ni abiertos Saneamiento periódico 	1	3	3	El producto está envasado y ultracongelado (zona 3)	PPR de infraestructuras (punto 2.5) PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9) PPR de limpieza y desinfección (punto 2.1)
Proliferación de <i>L. monocytogenes</i> en caso de regulación inadecuada de la temperatura	<ul style="list-style-type: none"> Control de la temperatura y el tiempo de almacenamiento (también durante el transporte) Metodología de trabajo: principio FIFO 	2	3	4		PPR del control de la temperatura (punto 2.4) PPR de la metodología de trabajo (punto 2.9)

Tabla 3. Vigilancia y medidas correctivas para PPRO definidos en el plan de APPCC (tabla 2)

Observaciones: cada EEA debe validar si estos PPRO son adecuados para el fin previsto y adaptarlos al modo de producción específico de la empresa.

PPRO o PCC	Fase del proceso de producción	Objetivo	Validación	Control	Medidas correctivas
PPRO 1	Agua contaminada y formación de biopelículas en tanques de lavado (para las fases de lavado), en el caso de productos no escaldados	Evitar la acumulación de <i>L. monocytogenes</i> en los tanques de lavado.	<ul style="list-style-type: none"> — Evaluar y definir qué volumen de agua de los tanques de lavado debe renovarse y con qué frecuencia. — Evaluar y definir las condiciones para el reciclado de agua y si es necesario tratar el agua. 	<ul style="list-style-type: none"> — Hacer un seguimiento de la frecuencia definida de renovación del agua o de rellenado de los depósitos de agua. — Hacer un seguimiento de las condiciones definidas para el reciclado o el tratamiento del agua (incluida su desinfección) cuando sea necesario. 	<ul style="list-style-type: none"> — Renovar y rellenar los depósitos de agua. — Revisar las condiciones para el reciclado o el tratamiento del agua.
PPRO 2	Escaldado de hortalizas	Tiempo de escaldado demasiado breve o temperatura demasiado baja, de modo que la <i>Listeria monocytogenes</i> puede proliferar en el agua o el producto	<ul style="list-style-type: none"> — Evaluar y definir si la temperatura / el tiempo podrían permitir el crecimiento o la proliferación de <i>L. monocytogenes</i> durante el proceso de escaldado para los distintos productos, cortes, temporadas, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> — Hacer un seguimiento del tiempo / la temperatura de escaldado conforme al tiempo / la temperatura validados para los distintos productos, cortes, temporadas, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> — Si el tiempo y la temperatura de escaldado no cumplen los criterios establecidos, debe evaluarse el potencial de proliferación de <i>L. monocytogenes</i>. — En caso de existir un potencial de proliferación, debe renovarse o tratarse el agua del proceso de escaldado y realizarse un muestreo de los productos para evaluar su posible contaminación.

<p>PPRO 3</p>	<p>Refrigeración tras el escaldado</p>	<p>Proliferación de la <i>L. monocytogenes</i> cuando la refrigeración es demasiado lenta (en caso de supervivencia tras el escaldado o de contaminación posterior al escaldado)</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Evaluar y determinar si la temperatura / el tiempo de refrigeración podrían permitir el crecimiento o la proliferación de <i>L. monocytogenes</i> durante la refrigeración posterior al escaldado — Evitar mantener la temperatura en un rango de entre 50 y 10 °C haciendo un seguimiento de la temperatura del agua o del flujo del producto — Evaluar y determinar si es preciso desinfectar el agua de refrigeración 	<ul style="list-style-type: none"> — Hacer un seguimiento del tiempo y la temperatura de refrigeración establecidos en la validación — Normalmente, reducir la temperatura del producto por debajo de los 10 °C en un minuto, dos como máximo (EFSA, 2018b) 	<ul style="list-style-type: none"> — Si el tiempo y la temperatura de refrigeración no cumplen los criterios establecidos, debe evaluarse el potencial de proliferación de <i>L. monocytogenes</i> — En caso de existir un potencial de proliferación, debe renovarse o tratarse el agua de refrigeración y realizarse un muestreo de los productos para evaluar su posible contaminación
<p>PPRO 4</p>	<p>Congelación de hortalizas en el túnel de congelación</p>	<p>Congelación demasiado lenta o fluctuaciones de temperatura en el congelador, lo que provoca una proliferación/contaminación de <i>L. monocytogenes</i>, a temperaturas de < -18 °C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Evaluar y definir el tiempo / la temperatura / los ciclos de congelación para cada grupo de productos (según la naturaleza de las hortalizas, su tamaño, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> — Hacer un seguimiento del tiempo / la temperatura del túnel de congelación y la temperatura de los productos — Supervisar que no se acumulen productos en el túnel de congelación 	<ul style="list-style-type: none"> — Si no se respeta el tiempo / la temperatura validados de un producto en particular durante su congelación, debe comprobarse si se están acumulando productos en el túnel de congelación — Evaluar si la temperatura del producto es superior a -4 °C (a esas temperaturas puede reaparecer la actividad microbiológica y la proliferación potencial de <i>Listeria monocytogenes</i>) — En tal caso, debe organizarse la limpieza/desinfección del túnel de congelación.

4. Muestreo ambiental para el control de verificación de la *Listeria monocytogenes* como patógeno ambiental y verificación de las medidas de prevención/control adoptadas

Dado que la *Listeria monocytogenes* es un patógeno ambiental y la acumulación microbiológica no es visualmente detectable, es preciso realizar un muestreo ambiental para controlar el posible anidamiento de *L. monocytogenes* en el entorno de producción. La vigilancia ambiental persigue un triple objetivo:

- 1) verificar la eficacia de sus medidas de prevención y control (prerrequisitos y plan de APPCC);
- 2) detectar *L. monocytogenes* y sus puntos de anidamiento en caso de encontrarse en la planta, y
- 3) garantizar que las medidas correctivas hayan eliminado la *L. monocytogenes* cuando se haya detectado en la planta.

A continuación, se citan referencias importantes en materia de muestreo ambiental:

- a) en la norma EN ISO 18593:2018, se describen los principios del procedimiento de toma de muestras para el muestreo ambiental;
- b) en el método normalizado de la norma EN ISO 11290, parte 1, se incluye el análisis de muestras ambientales para la detección de *L. monocytogenes*;
- c) el laboratorio de referencia de la Unión Europea para *L. monocytogenes* ha facilitado un documento con orientaciones específicas sobre el muestreo de zonas y equipos de transformación para la detección de *Listeria monocytogenes* (EURL – *L. monocytogenes*, 2012);
- a) *Urgent scientific and technical assistance to provide recommendations for sampling and testing in the processing plants of quick-frozen vegetables aiming at detecting L. monocytogenes* («Asistencia científica y técnica urgente para ofrecer recomendaciones sobre el muestreo y la realización de pruebas en las plantas transformadoras de hortalizas ultracongeladas con el propósito de detectar *L. monocytogenes*») (EFSA, 2018b);
- b) en Lakshmikanta (2013) y CAC (2007), figuran asimismo referencias a protocolos de análisis ambiental;
- c) en Zoellner *et al.* (2019), se expone un interesante enfoque de modelización para determinar la ubicación y el momento más adecuados para realizar un muestreo en una planta de producción de productos congelados.

4.1 ¿*Listeria* spp. o *L. monocytogenes*?

Cabe señalar que, en ocasiones, las empresas de fabricación de alimentos dan preferencia a la vigilancia ambiental de la presencia de *Listeria* spp. no patógena como indicador de *L. monocytogenes*. Considerar este grupo más amplio, la *Listeria* spp., como organismos indicadores podría conllevar una verificación más sólida del saneamiento adecuado de las condiciones ambientales (y, por ende, ser un buen indicador de un proceso de higiene adecuado), así como permitir corregir situaciones que puedan provocar la contaminación por *L. monocytogenes* (CAC, 2007). Sin embargo, el uso de *Listeria* spp. como organismo indicador o marcador de la presencia de *L. monocytogenes* es discutible. La *Listeria* spp. también incluye otras especies que no son patógenas y que también son microorganismos ubicuos encontrados ocasionalmente en alimentos o en un entorno de producción alimentaria. Por tanto, la mera presencia de *Listeria* spp. no indica necesariamente la presencia del patógeno *L. monocytogenes*. Según la EFSA (2018b), es aconsejable realizar pruebas directamente para detectar *L. monocytogenes* siguiendo el protocolo de la norma EN ISO 11290, parte 1 (detección) y, en caso de obtener un resultado positivo, es muy recomendable que, cuando se confirme que las colonias aisladas son *L. monocytogenes*, estas se envíen a un laboratorio nacional de referencia o al laboratorio de referencia de la Unión Europea para proceder a una caracterización más detallada (tipificación). Naturalmente, en caso de investigarse brotes de listeriosis cuyo objetivo sea rastrear la posible fuente de *Listeria monocytogenes*, es preciso realizar pruebas para la detección de *L. monocytogenes* (EFSA, 2018b).

4.2 Puntos de muestreo

El plan de vigilancia ambiental debe incluir los puntos de muestreo seleccionados en función de su potencial para contaminarse por *Listeria monocytogenes*. Corresponde al EEA recopilar información cronológica sobre los resultados de las pruebas de este control, a fin de poder detectar aspectos críticos del entorno de producción,

como por ejemplo determinados equipos (en contacto directo o indirecto), determinados períodos del año, la elaboración de determinados productos, etc. Un EEA puede crear una extensa lista de puntos de muestreo (que incluya superficies que estén en contacto con alimentos y superficies que no lo estén) de las que se tomen muestras aleatoriamente, si bien es aconsejable que, tras un período de tiempo, se realicen pruebas en todos estos puntos de muestreo. Se recomienda diferenciar los puntos de muestreo según su potencial de contaminación cruzada de los productos alimenticios por *Listeria monocytogenes* y de anidar dicho organismo. En la tabla 4 se muestra un ejemplo de diferenciación. En el documento de referencia de la EFSA 2018b, se ofrece una extensa lista de posibles puntos de muestreo. Se aconseja definir puntos de muestreo fijos y puntos de muestreo rotatorios, que cambien en cada momento de muestreo en una proporción de 70/30, esto es, que el 70 % de los puntos sean fijos y el 30 % de los puntos se vayan alternando en cada ronda de muestreo.

Tabla 4. Sinopsis de los tipos de superficies que están en contacto con los alimentos y que no lo están, posibles puntos de muestreo y frecuencia de muestreo propuesta (basada en la tabla 1)

Tipo	Descripción	Ejemplos de puntos de muestreo	Frecuencia propuesta de muestreo
1	Superficies en contacto directo con los alimentos	Interior de tanques, embalajes y aparatos transportadores, tolvas, interior de tuberías	Semanal
2	Superficies que no están en contacto con los alimentos, muy próximas a superficies que sí lo están	Soportes para alojar equipos, paredes, suelos o desagües directamente junto a superficies en contacto con los alimentos	Mensual
3	Superficies más alejadas que no están en contacto con los alimentos y que podrían provocar con el tiempo una contaminación	Vehículos elevadores, ruedas de contenedores de basura o dispositivos, limpiadores de suelas para el personal, suelos y desagües que no están en contacto directo con superficies en contacto con los alimentos	Semestral
4	Superficies que no están en contacto con los alimentos y zonas alejadas del entorno de transformación	Pasillos fuera de la zona de producción, zonas en las que se almacenan materias primas o productos acabados. Soportes para alojar equipos, paredes, suelos o desagües NO directamente junto a superficies en contacto con los alimentos	Semestral

4.3 Frecuencia, momento, zona y técnicas de muestreo

La **frecuencia de muestreo** ha de ser más intensiva en aquellas zonas que requieran un régimen de alto nivel de higiene (véase el punto 2.5, relativo a las infraestructuras) y en aquellos puntos de muestreo pertenecientes a los tipos 1 > 2 > 3 y 4. En caso de investigarse un brote, es preciso seguir un plan de muestreo más conciso, como el presentado por la EFSA (EFSA, 2018b).

Además de los puntos y las frecuencias de muestreo, puede especificarse también el **momento de muestreo** adecuado en el que se tomarán las muestras ambientales. El momento más importante para tomar estas muestras es varias horas después de comenzar la producción (p. ej., a las tres o cuatro horas) o preferiblemente inmediatamente antes de la limpieza, pues de este modo se permite que la *L. monocytogenes* (en caso de detectarse) emerja de los puntos en los que anide y contamine el entorno de producción. Debe preverse la rotación en lo que respecta a la fecha y la hora de la toma de muestras para obtener un diagrama de dispersión completo de las posibles contaminaciones. Si las muestras se toman demasiado pronto después de la desinfección, el agente desinfectante podría no haberse neutralizado debidamente e interferir en la prueba analítica. Puede encontrarse más información al respecto en el documento de la EFSA 2018b. Como se menciona en el punto 3.1, el objetivo de este muestreo ambiental no es verificar si las actividades de limpieza y desinfección llevadas a cabo son eficaces, sino obtener una verificación completa de las medidas preventivas y correctivas adoptadas para el control de la *L. monocytogenes*.

Diversas técnicas y zonas de muestreo se describen en términos generales en la norma EN ISO 18593:2018 y se precisan en las directrices del laboratorio de referencia de la Unión Europea sobre el muestreo de equipos y de la zona de transformación de alimentos para la detección de *Listeria monocytogenes* (EURL – *Listeria monocytogenes*, 2012). En resumen:

- A efectos del muestreo de **grietas y zonas reducidas o estrechas y difíciles de alcanzar**, se emplean hisopos para tomar las muestras; normalmente se somete a muestreo una superficie de $\leq 100 \text{ cm}^2$ (p. ej., en las grietas estrechas se toman muestras a lo largo de varios metros).
- A efectos del muestreo de **grandes superficies**, se emplean paños o esponjas estériles; normalmente, se somete a muestreo una superficie total de $> 100 \text{ cm}^2$, lo más grande posible para aumentar la probabilidad de detectar *Listeria monocytogenes*. Se recomienda tomar muestras en una superficie de entre 1 000 y 3 000 cm^2 .

4.4 Tratamiento de datos y análisis/observación de tendencias

A partir de los resultados del análisis, se puede crear una base de datos y de conocimientos históricos. Puede obtenerse la siguiente información con el fin de conocer mejor las posibles vías de contaminación, en el marco de la observación de tendencias: sensibilidad del punto de muestreo, producto involucrado, época del año (variabilidad estacional), personal implicado y otros aspectos que puedan afectar a la contaminación, como el mantenimiento técnico, cambios en el personal, cambios en los equipos, el uso estacional de equipos, etc. Esta observación de tendencias puede contribuir, en la trayectoria de aprendizaje del EEA, a que este comprenda cuándo puede ser más sensible el entorno de su fábrica a la contaminación por *L. monocytogenes*. Un plano de la planta en el que se indiquen los puntos críticos sensibles a la contaminación puede facilitar la comunicación. Tras el análisis de las tendencias y los datos, los programas de vigilancia ambiental deben adaptarse para obtener nueva información.

4.5 Medidas correctivas

En caso de obtener un resultado positivo en una prueba de seguimiento de la presencia de *L. monocytogenes*, es preciso realizar un análisis más detenido de los puntos de muestreo que hayan arrojado dicho resultado positivo y de la zona circundante más amplia, y se deben adoptar medidas correctivas adicionales. A efectos del análisis de las causas subyacentes y para evitar futuros problemas, se han de adoptar las siguientes medidas:

- a) Al detectarse *L. monocytogenes* en una prueba ambiental, es muy recomendable conservar las colonias aisladas en caso de que el EEA requiera una investigación (interna) en mayor profundidad. Dicha investigación puede consistir en la caracterización de la cepa, en particular, el genotipado, para poder rastrear la fuente microbiana. Por ejemplo, en caso de obtenerse resultados positivos recurrentes en las pruebas para la detección de *L. monocytogenes*, el genotipado de las colonias aisladas obtenidas puede revelar información respecto a si la *L. monocytogenes* recurrente está vinculada a una cepa «interna» específica y persistente de *Listeria monocytogenes* o no. Esta recomendación también es importante en caso de una detección positiva en la muestra de un producto (véase el punto 5.1).
- b) Es preciso realizar una limpieza y desinfección intensivas de la zona de muestreo y, a continuación, un control de seguimiento más intensivo hasta que se haya resuelto la contaminación.
- c) Para evaluar la posible contaminación de los alimentos transformados, se han de vincular los lotes de productos ultracongelados elaborados en el mismo período en que tuvo lugar la contaminación ambiental positiva:
 - c1) Es preciso llevar a cabo una evaluación de riesgos bien documentada y un análisis u observación de tendencias con respecto a los lotes que se transformaron cuando se produjo la contaminación, teniendo en cuenta otros datos históricos sobre la contaminación de lotes de productos por *L. monocytogenes* o pruebas ambientales que se hayan registrado antes de la última incidencia por *L. monocytogenes* en la empresa. La evaluación de riesgos puede incluir, entre otros, la detección de posibles vías de contaminación desde el entorno de producción hasta

los alimentos, el tipo de materia prima o ingredientes utilizados y la información de su proveedor, cualquier actividad inusual dentro de la empresa (p. ej., cambios en el personal, trabajos de construcción en curso, cambios en los procedimientos de limpieza y desinfección, uso de equipos estacionales, distintos parámetros del proceso, etc.), y debe basarse en datos históricos de pruebas relativas a los productos y al entorno.

c2) A falta de resultados de pruebas relativas a productos finales (datos históricos), y si una evaluación de riesgos sugiere una mayor probabilidad de contaminación de los lotes congelados durante el período en el que se produjo la contaminación ambiental detectada, es aconsejable realizar un muestreo de los lotes afectados para confirmar si el lote o los lotes de productos finales están contaminados y deberían considerarse inaceptables (se recomienda, como mínimo, n = 5 unidades de muestras por lote analizado para la detección de *L. monocytogenes* en 25 g).

En resumen, los datos históricos disponibles [véase la letra c1)], junto con los datos del muestreo de productos finales temporalmente intensificado [de ser necesario; véase la letra c2)] en aquellos lotes de productos ultracongelados que se hayan elaborado en el mismo período en el que las pruebas de vigilancia ambiental hayan arrojado resultados positivos de *L. monocytogenes*, deben demostrar que el producto final se ajusta al límite intermedio fijado para el producto (preferiblemente, *L. monocytogenes* no detectada en 25 g y siempre por debajo de 10 ufc/g, o cualquier otro límite intermedio fijado; véase el punto 5.1). Por consiguiente, es preciso efectuar una evaluación de riesgos bien documentada, así como realizar un análisis u observación pormenorizado de tendencias que permita vincular los resultados del muestreo ambiental con las muestras de productos, a fin de recopilar datos históricos.

- d) Evaluar la posible formación de biopelículas, encontrar la fuente de la contaminación y estudiar medidas específicas para eliminar las biopelículas.
- e) El programa de vigilancia debe adaptarse (es decir, buscar otros puntos de muestreo, modificar la frecuencia), a fin de realizar un mejor seguimiento en el futuro.
- f) Organizar una comunicación clara con las personas involucradas en la limpieza y desinfección, el mantenimiento y las actividades operativas relacionadas con la contaminación detectada, así como con los responsables de estas funciones.

4.6 Procedimiento de análisis ambiental de la *L. monocytogenes*

El EEA debe establecer un procedimiento de análisis ambiental, que debe incluir los siguientes aspectos:

- 1) establecimiento de puntos de muestreo;
- 2) determinación del tamaño de la superficie objeto del muestreo (cm² que han de frotarse);
- 3) definición de la frecuencia de muestreo (consideración de distintos regímenes de higiene y tipo de puntos de muestreo; véase el cuadro 4), así como del momento de muestreo;
- 4) protocolo seguido para la detección de *Listeria* spp. o *L. monocytogenes* en muestras ambientales en un laboratorio de control de la calidad (véase EFSA, 2018b);
- 5) método de toma de muestras (hisopo u otros) y transporte de las muestras al laboratorio;
- 6) análisis de las tendencias de los resultados obtenidos, a fin de poder definir posibles medidas correctivas o preventivas adicionales que se deban adoptar a modo de corrección;
- 7) previsión de una revisión anual del procedimiento de análisis ambiental para introducir actualizaciones acordes a los nuevos avances en las zonas de producción (p. ej., equipos nuevos, zonificación distinta, etc.), los elementos nuevos en los métodos de producción, etc., y mantener el procedimiento actualizado;
- 8) designación de una persona responsable de diseñar este procedimiento, supervisarlos y adoptar medidas en caso de una posible contaminación;
- 9) definición de un canal de comunicación dentro de la organización en caso de detectarse un resultado positivo y tener que adoptar medidas correctivas.

5. Especificaciones del producto final y comunicación de los riesgos a los usuarios de hortalizas ultracongeladas

Es evidente que, aunque se disponga de PPR, de un APPCC y de un SGSA bien implantado, no puede descartarse la posibilidad de que, en ocasiones, algunos productos ultracongelados se contaminen con bajos niveles de *L.*

monocytogenes (detectada por cada 25 g, pero normalmente en una cantidad inferior a 10 ufc/g). La presencia de *L. monocytogenes* puede surgir al no incluirse en el proceso de producción una fase de plena inactivación térmica (el escaldado está concebido como un tratamiento térmico tecnológico y no está necesariamente validado para conseguir una reducción logarítmica de 6 de la *L. monocytogenes*; véase la sección 3, sobre el plan de APPCC). Además, el proceso de ultracongelación tiene lugar tras el escaldado y es un proceso abierto, por lo que, aunque se respete un estricto PPR, no es posible evitar por completo la contaminación por *L. monocytogenes* en los procesos de producción y las infraestructuras habitualmente empleados en la industria de las hortalizas ultracongeladas (véase la sección 3, sobre el plan de APPCC). Las presentes directrices se refieren a las hortalizas congeladas que no se consideran listas para el consumo (NLPC).

Por tanto, es importante seguir una **estrategia de comunicación clara** para informar a los usuarios acerca de las hortalizas ultracongeladas, ya se trate de un contexto B2B (como la industria alimentaria, los servicios de *catering* institucional o las actividades de hostelería y restauración) o B2C (hortalizas ultracongeladas distribuidas a los consumidores a través de actividades de venta al por menor). Para ello, no solo deben emplearse el etiquetado o las especificaciones técnicas del producto final, sino también otros canales de comunicación, como sitios web, recetas, folletos informativos, redes sociales, etc. La comunicación ha de ser coherente para evitar interpretaciones erróneas acerca de cómo almacenar, descongelar y preparar o utilizar estas hortalizas congeladas correctamente.

En la presente sección, se proponen principios del plan de muestreo para la realización de pruebas en el producto final, especificaciones del producto final y estrategias de comunicación de riesgos, partiendo de la prueba de estimulación realizada (anexo III) y del dictamen de la EFSA (EFSA, 2020).

5.1 Prueba relativa a un límite intermedio fijado para la *L. monocytogenes* con objeto de verificar el sistema de gestión de la seguridad de los alimentos (SGSA)

Es posible definir distintas estrategias de muestreo del **producto final (B2B o B2C)** (p. ej., muestreo de lotes para autorizarlos, control para la detección de un índice de prevalencia de patógenos en alimentos sobre la base de enfoques estadísticos).

Sin embargo, el muestreo es una herramienta en el marco de la **verificación del SGSA** con la que obtener información sobre la seguridad de los alimentos elaborados con el actual proceso de producción y sistema de gestión de la seguridad de los alimentos implantado. Las pruebas realizadas en el producto final reflejan la integración eficaz de todas las fases de prevención y control en la formulación y fabricación del alimento comercializado (Zwietering *et al.*, 2016). El **muestreo durante todo el año**, en el marco de la verificación, permitirá al EEA obtener información sobre la variabilidad de la contaminación, así como realizar un análisis u observación de tendencias (p. ej., ¿en qué período del año o en qué tipo de hortalizas ultracongeladas se localizan más problemas, y cuál podría ser el motivo de ello?). El tamaño real de la muestra (o el número de muestras) para la realización de pruebas en el producto final, en el marco de la verificación del SGSA, a menudo viene determinado desde la perspectiva de lo que es económicamente viable o los requisitos de los clientes. Estos **planes de muestreo aleatorio por conveniencia** también se conocen como planes de muestreo prácticos o empíricos (CAC, 2004). El número y el tipo de muestras se seleccionan mayoritariamente de forma intuitiva, sobre la base de la experiencia y los conocimientos del gestor de la calidad o las operaciones de la instalación de producción acerca de los puntos y momentos de muestreo (Uyttendaele *et al.*, 2018).

En la producción y el comercio de hortalizas ultracongeladas, los EEA que se dediquen a la producción de este tipo de hortalizas deben diseñar un **plan de muestreo del producto final para todo el año en el marco de la verificación del SGSA**, con el fin de verificar las medidas de prevención y control aplicadas para controlar la *L. monocytogenes* (figura 1). En dicho plan de muestreo, es preciso establecer el número de muestras del producto final tomadas cada año de distintas hortalizas ultracongeladas como productos finales (B2B o B2C), así como la frecuencia de muestreo (o intervalo entre cada muestreo), teniendo en cuenta lo siguiente:

- distintas categorías de productos ultracongelados (es decir, tipo de hortaliza, productos individuales o mezclados);
- el tipo de proceso de producción (escaldado o no escaldado);
- el volumen de producción;
- la sensibilidad potencial a la presencia de *L. monocytogenes*;
- la estacionalidad de la producción;
- el potencial para favorecer la proliferación o no (véase el punto 4.1);
- etc.

En un plan de muestreo para todo el año en el marco de la verificación, las muestras se analizan para detectar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g. En caso de detectarse *L. monocytogenes* en 25 g, es preciso efectuar un recuento en las mismas muestras para verificar si se alcanzan o no los límites intermedios fijados (< 10 ufc/g). No obstante, es probable que, debido a la distribución heterogénea de la contaminación por *Listeria monocytogenes* en un lote, algunos productos estén contaminados y otros no. Por tanto, es posible que al volver a analizar la misma muestra se obtengan resultados distintos. Por este motivo, en el plan de muestreo para todo el año, se recomienda efectuar un recuento directo de *Listeria monocytogenes* cada cierto tiempo (p. ej., realizar cada x muestras un recuento directo de *L. monocytogenes* para demostrar que no se ha excedido el límite intermedio de < 10 ufc/g). Los protocolos analíticos son los que figuran en la norma EN ISO 11290, parte 1 (detección de *L. monocytogenes* en alimentos) y parte 2 (recuento de *L. monocytogenes* en alimentos), u otros métodos rápidos equivalentes (validados conforme a la norma ISO 16140). En caso de detección positiva, puede ser útil que un laboratorio nacional de referencia reconocido o el laboratorio de referencia de la unión europea para la *L. monocytogenes* (EURL para la *L. monocytogenes*) caracterice de forma más detallada las colonias aisladas (tipificación) (EFSA, 2018b). Por ejemplo, en caso de obtenerse resultados positivos recurrentes en las pruebas para la detección de *L. monocytogenes*, el genotipado de las colonias aisladas obtenidas puede revelar información respecto a si la *L. monocytogenes* recurrente está vinculada a una cepa «interna» específica y persistente de *Listeria monocytogenes* o no (véanse asimismo las medidas correctivas para la vigilancia ambiental, punto 4.5). Además, partiendo del muestreo del producto final, puede efectuarse un **análisis u observación de tendencias** para obtener información sobre la posible contaminación de los productos y las fuentes de la contaminación de los factores anteriormente indicados.

5.2. Especificaciones del producto final y comunicación de riesgos

Las presentes directrices se refieren a las hortalizas congeladas que no se consideran listas para el consumo (NLPC). Sin embargo, Profel es consciente de que algunos consumidores (profesionales o no) podrían no leer la etiqueta y tiene en cuenta el «uso indebido razonablemente previsto», esto es, el hecho de que algunas de estas hortalizas congeladas se utilicen como si estuvieran listas para el consumo y no se cocinen previamente. Asimismo, el sector tiene en cuenta el «uso indebido razonablemente previsto» que hacen algunos consumidores al no descongelar adecuadamente el alimento o no calentarlo meticulosamente (menos de dos minutos a 70 °C).

Por tanto, el objetivo del sector es prevenir, con las mejores prácticas establecidas en las directrices, la contaminación de alimentos congelados por *L. monocytogenes* (es decir, que no se detecte el valor objetivo en 25 g) y, sobre la base de una prueba de estimulación (véase el anexo III), incluido el uso indebido razonablemente previsto durante la descongelación en condiciones de refrigeración (pruebas de estimulación realizadas en un refrigerador a 9 ± 1 °C, es decir, una temperatura superior a la recomendada en la etiqueta, y empleando una cepa aislada de *L. monocytogenes* en rápido crecimiento obtenida del brote de 2018 en maíz dulce congelado), el sector ha fijado un límite intermedio de < 10 ufc/g.

Cabe señalar que la posibilidad de obtener falsos resultados positivos es baja, tanto en el caso del método de detección de *L. monocytogenes* (ISO 11290-1) como en el método de recuento de *L. monocytogenes* (ISO 11290-2), así como en los métodos de detección rápidos equivalentes validados conforme a la norma ISO 16140; no obstante, una distribución bacteriana heterogénea podría en efecto arrojar discordancias entre los resultados, si el recuento y la detección se realizan en una submuestra del lote distinta, especialmente en el

caso de recuentos bajos. Asimismo, conviene destacar que el muestreo y la realización de pruebas están sujetos a restricciones para garantizar la seguridad de los alimentos de un lote (más información en el sitio web de la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos, <http://www.icmsf.org/>).

Sobre la base de la prueba de estimulación (véase el anexo III), el dictamen de la EFSA (2020) y el debate entre expertos en el marco de la elaboración de las presentes directrices en materia de higiene, **se proponen las siguientes especificaciones del producto final, combinadas con la etiqueta del producto y la comunicación de riesgos, para las hortalizas ultracongeladas (como productos no listos para el consumo):**

	Valor objetivo tras la producción	Límite intermedio tras la producción	A lo largo de su vida útil durante el almacenamiento congelado y el descongelado / almacenamiento en refrigerador ¹
<i>L. monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g (a)	< 10 ufc/g (b)	< 100 ufc/g (c)

¹Téngase en cuenta que se presupone que las hortalizas congeladas son alimentos NLPC.

- El objetivo si se cumplen las directrices en materia de higiene de todo el sector para el control de la *L. monocytogenes* en la producción de hortalizas ultracongeladas.
- Aunque se disponga de PPR, de un APPCC y de un SGSA bien implantado, no puede descartarse la posibilidad de que ocasionalmente algunas hortalizas ultracongeladas se contaminen con bajos niveles de *L. monocytogenes*, por lo que el límite intermedio puede establecerse en < 10 ufc/g.
- El objetivo de seguridad de los alimentos en materia de *L. monocytogenes* para garantizar alimentos inocuos para los consumidores (para el grupo de población no predispuesto; véase la definición en el punto 5.2.2).

5.2.1. Comunicación de riesgos en la etiqueta del producto

Teniendo en cuenta el resultado de la prueba de estimulación con *L. monocytogenes* para analizar el comportamiento del patógeno durante el descongelado o el almacenamiento refrigerado de hortalizas congeladas en unas condiciones razonablemente previstas en el hogar del consumidor (véase el anexo III), es recomendable comunicar los riesgos e informar de ello en mayor detalle a los usuarios en la etiqueta del producto, las especificaciones técnicas, la información de sitios web, las redes sociales, etc. Partiendo de los resultados y el potencial diferente de proliferación de la *L. monocytogenes* obtenidos en la prueba de estimulación llevada a cabo (anexo III), así como de los modelos de proliferación realizados por la EFSA (EFSA, 2020), se aconseja utilizar distintas formas de comunicación de los riesgos en el caso del maíz dulce congelado y el boniato congelado respecto a otras hortalizas congeladas.

1) En el caso del maíz dulce y los boniatos congelados:

Habida cuenta de que el potencial de proliferación establecido de la *L. monocytogenes* es superior a 1 log₁₀ durante un período de veinticuatro horas de descongelado o almacenamiento refrigerado, el maíz dulce y los boniatos congelados deben considerarse alimentos no listos para el consumo.

Por tanto, se aconseja la comunicación coherente y a nivel de todo el sector al consumidor por medio de la etiqueta del envase de venta al por menor. La etiqueta de los productos finales envasados, en el caso de los envases B2B o B2C, debe mencionar claramente lo siguiente:

- las condiciones para un almacenamiento congelado adecuado (tiempo/temperatura) a -18 °C y -12 °C;
- recomendaciones sobre el uso de los productos:

- a. *necesidad de cocinado (producto NLPC) e instrucciones para cocinarlo (p. ej., modo, tiempo y temperatura)*;*
- b. *«cocinar sin descongelar» (se recomienda no descongelarlo previamente y almacenarlo refrigerado / no consumirlo sin calentarlo minuciosamente, es decir, al menos dos minutos a más de 70 °C).*

* Además, el consumo de hortalizas congeladas como alimentos LPC por parte de los usuarios finales puede desalentarse haciendo referencia en la etiqueta a instrucciones de preparación (diversas sugerencias de tratamiento térmico).

2) En el caso de otras hortalizas congeladas:

Habida cuenta de que el potencial de proliferación establecido de la *L. monocytogenes* es inferior a 1 log₁₀ durante un período de veinticuatro horas de descongelado o almacenamiento refrigerado, el resto de las hortalizas congeladas sometidas a la prueba de estimulación (guisantes, chirivías y repollo blanco), así como las demás hortalizas congeladas incluidas en la categoría de hortalizas congeladas y con una puntuación de riesgo inferior a la de las cinco hortalizas congeladas seleccionadas para la prueba de estimulación con *L. monocytogenes* (véase el anexo III), no deben descongelarse ni almacenarse en condiciones de refrigeración durante más de veinticuatro horas. También deben utilizarse como alimentos no listos para el consumo.

Se aconseja comunicar lo siguiente al consumidor, de manera coherente y a nivel de todo el sector, por medio de la etiqueta del envase de venta al por menor. La etiqueta de los productos finales envasados, en el caso de los envases B2B o B2C, debe mencionar claramente lo siguiente:

- 1) las condiciones para un almacenamiento congelado adecuado (tiempo/temperatura) a -18 °C y -12 °C;
- 2) recomendaciones sobre el uso de los productos:
 - a. *necesidad de cocinado (producto NLPC) e instrucciones para cocinarlo (p. ej., modo, tiempo y temperatura)*;*
 - b. *instrucciones de descongelado (en caso necesario);*
 - c. *el descongelado y el almacenamiento refrigerado deben limitarse a un máximo de veinticuatro horas a 5-7 °C**.*

* Además, el consumo de hortalizas congeladas como alimentos LPC por parte de los usuarios finales puede desalentarse haciendo referencia en la etiqueta a instrucciones de preparación (diversas sugerencias de tratamiento térmico).

** Temperatura de refrigeración de entre 5 y 7 °C o conforme a lo especificado por la autoridad nacional competente, dado que la legislación nacional en materia de temperatura de los productos puede variar entre los Estados miembros de la UE.

5.2.2. Comunicación de los riesgos a grupos predispuestos

En caso de que las hortalizas congeladas estén destinadas a servicios de *catering* o a servirse a consumidores predispuestos, dichas hortalizas congeladas deben considerarse NLPC, por lo que es obligatorio someterlas a un tratamiento térmico adecuado durante su preparación y comunicárselo claramente al proveedor de los servicios de *catering* o al grupo predispuesto a la listeriosis, en particular las mujeres embarazadas, la personas de más de 74 años y los pacientes con inmunodeficiencia, esto es, pacientes con enfermedades subyacentes detectadas, como enfermedades hepáticas, cáncer y diabetes, o sometidos a un trasplante de órganos. Estos grupos de personas, cuyas condiciones subyacentes se han asociado a la incidencia más elevada de listeriosis, representan aproximadamente al 1 % de la población total (de Francia), pero han supuesto un 43 % de los casos y un 55 % de los fallecimientos (Goulet *et al.*, 2012). En lugar de dirigirse a estas personas directamente, también podría ser de utilidad informar claramente al personal médico, los profesionales sanitarios o los cuidadores que les atienden, o a quienes les orientan en materia de alimentación, acerca de la necesidad de aplicar unas condiciones de descongelación adecuadas («el descongelado y el almacenamiento refrigerado deben limitarse a un máximo de veinticuatro horas a 5-7 °C») y que en todas las hortalizas ultracongeladas se

recalque la «necesidad de cocinarlas minuciosamente, como mínimo dos minutos a más de 70 °C» antes de consumirlas.

La comunicación dirigida a estos grupos de consumidores predispuestos es una iniciativa que también han de adoptar las agencias de salud pública, las autoridades en materia de seguridad de los alimentos o las organizaciones no gubernamentales que intervengan en este ámbito del sector sanitario. No obstante, también es una responsabilidad compartida con otras partes interesadas de la cadena alimentaria: concretamente, es preciso tener en cuenta este tipo de comunicación del riesgo cuando las hortalizas ultracongeladas se vendan en un contexto B2B a los servicios de *catering* institucionales de hospitales o residencias.

Con todo, las hortalizas ultracongeladas siguen siendo la mejor (y la única) alternativa, si se someten debidamente a un tratamiento térmico antes de consumirlas, para que aquellas personas con afecciones o enfermedades subyacentes detectadas que afectan a su inmunidad celular, así como las mujeres embarazadas, puedan consumir hortalizas (como parte de una dieta saludable), ya que el consumo de productos frescos por parte de este tipo de grupos predispuestos que necesitan una dieta con baja carga microbiana (neutropénica) no es aconsejable.

En los siguientes enlaces pueden encontrarse orientaciones para estas personas o para los profesionales sanitarios:

- <https://www.health.belgium.be/nl/advies-9311-listeriose> y el anexo de este documento descargable (en neerlandés y francés), que contiene varios enlaces a recomendaciones en varios países;
- <https://www.food.gov.uk/research/research-projects/development-of-an-initial-report-for-reducing-the-risk-of-vulnerable-groups-contracting-listeriosis> o.
<https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/listeria-guidance-june2016-rev.pdf>

Annex I: legal references

Commission Notice C278/2016. Commission notice on the implementation of food safety management systems covering prerequisite programs (PRPs) and procedures based on the HACCP principles, including the facilitation/flexibility of the implementation in certain food businesses (2016/C 278/01). Official Journal of the European Union: C 278/271-C 278/232.

Commission Notice C163/2017. Commission notice on guidance document on addressing microbiological risks in fresh fruits and vegetables at primary production through good hygiene (2017/C 163/01). Official Journal of the European Union: C 163/1

Directive (EC) 89/109. Council Directive 89/108/EEC of 21 December 1988 on the approximation of the laws of the Member States relating to quick-frozen foodstuffs for human consumption

Regulation (EC) No 178/2002 Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. OJ L 31, 1.2.2002, p. 1–24

Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. OJ L 139, 30.4.2004, p. 1–54

Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. OJ L 338, 22.12.2005, p. 1–26
Regulation (EC) No 528/2012 of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products.

Annex II: other references

AFFI (American frozen food institute). *Listeria* control Plan. www.affifoodsafety.org.

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13.

CAC (1976). Code of Practice for the processing and handling of quick-frozen foods (CAC/RCP 8-1976).

CAC (2004). CAC/GL 50-2004 General guidelines on sampling.

CAC (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61 - 2007

CAC (2015). Standard for quick-frozen vegetables CXS 320-2015

Devlieghere, F., Rajkovic, A., Samapundo, S., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Jacxsens, L. Debevere, J. (2013). Food microbiology and analysis. Laboratory of Food Microbiology and Food Preservation, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University.

ECDC (2016). https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-listeriosis.pdf

EFSA (2018a). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1448

EFSA (2018b). Urgent scientific and technical assistance to provide recommendations for sampling and testing in the processing plants of frozen vegetables aiming at detecting *Listeria monocytogenes*. EFSA-2018-0141. EFSA Journal.

EFSA and ECDC (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500, 262 pp

EFSA (2020). The public health risk posed by *Listeria monocytogenes* in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. EFSA Journal 2020;18(4):6092. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6092

EN ISO 11290 part 1 (2017). Microbiology of the food chain – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – part 1: detection method. International organization for standardization, Geneva.

EN ISO 11290 part 2 (2017). Microbiology of the food chain – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – part 2: enumeration method. International organization for standardization, Geneva.

EN ISO 18593 (2018). Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling. International organization for standardization, Geneva.

EURL-*L. monocytogenes* (2012). Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *L. monocytogenes*. Version 3 – 20/08/2002.

EURL – *L. monocytogenes* (2019). Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 3 of 6 June 2015 - Amendment 1 of 21 February 2019.

Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H, Desenclos JC. (2012). Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis.* 1;54(5):652-60.

ICMSF: <http://www.icmsf.org/>

Lakshmikantha, C. (2013). Environmental Monitoring Program: An Early Warning System for Microbiological Hazards. *Quality Assurance and Food Safety*. <https://www.qualityassurancemag.com/article/aib1213-environmental-monitoring-program>

McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 15–33.

Pocheville, A.(2015).The Ecological Niche: History and Recent Controversies. In Heams, Thomas; Huneman, Philippe; Lecointre, Guillaume; et al. (eds.). *Handbook of Evolutionary Thinking in the Sciences*. Dordrecht: Springer. pp. 547–586. ISBN 978-94-017-9014-7.

Turner, D.E., Daugherty, E.K., Altier, C. and Maurer K.J. (2010). Efficacy and Limitations of an ATP-Based Monitoring System. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010 Mar; 49(2): 190–195.

Uyttendaele, M., De Loy-Hendrickx, A., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Debevere, J. en Devlieghere, F. (2018). Microbiological guidelines: support for interpretation of microbiological test results of foods. *Die Keure*, ISBN978 2 87403 503 6.

Van Walle I., Björkman J.T., Cormican M., Dallman T., Mossong J., Moura A., Pietzka A., Ruppitsch W., Takkinen J., European *Listeria* WGS typing group. Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. *Euro Surveill.* 2018;23(33) via <https://ecdc.europa.eu/en/listeriosis/microbiology>

Zoellner, C., Jennings, R., Wiedmann, M. and Ivanek, R. (2019). EnABLE: an agent-based model to understand *Listeria* dynamics in food processing facilities. *Nature Scientific reports* (www.nature.com/scientific-reports), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30679513>

Zwietering, M.H., Jacxsens, L., Membre, J.M., Nauta, M. and Peterz, M. (2016). Relevance of microbial finished product testing in food safety management. *Food Control*, 60, 31-43.

Annex III: Technical report on challenge testing to assess behaviour of *Listeria monocytogenes* during defrosting/refrigerated storage of frozen vegetables under reasonably foreseen conditions at consumer's home

1) Set-up of the *L. monocytogenes* challenge testing

- i. Categorization of vegetables: To identify the most relevant products for the challenge tests, a categorization of frozen vegetables was made based on characteristics such as pH, sugar content, anti-bacterial compounds, nutrient level, structure/texture of the product.
- ii. Refrigeration time: after discussion, it was agreed that tests should not be performed in ambient temperature; this falls out of the responsibility of the producer. The tests should focus on growth potential during shelf life (meaning up to 24h in the fridge). In order to evaluate one step further, it was agreed to make an analysis also after 48h in the fridge.
- iii. Refrigeration temperature: It was agreed to use a temperature of 9°C (as accepted/recommended temperature for *L. monocytogenes* challenge testing in Belgium (by FASFC) & the Netherlands (NVWA) and supported by the data presented by Roccato et al. (2017) as published in the peer reviewed journal of Food Research International (2017: 96, 171–181) to mimic reasonably foreseen abuse both for countries of the South and North of EU.
- iv. Batches: it was agreed to work with 3 batches of the selected frozen vegetable from 3 different producers, if possible. The first batch was delivered to the lab/subjected to testing in March, the 2nd batch was delivered to the lab/subjected to testing in April-May; the 3rd batch was delivered to the lab/subjected to testing in July-August 2019;
- v. Sample size: it was agreed to use samples of 200g, the equivalent of a consumer portion of frozen vegetables (per sampling time a single pack of 200g was prepared and inoculated; a minimum of 150g is required for all the analyses scheduled).
- vi. *L. monocytogenes* strains: The challenge test was performed by the academic service laboratory of the Food Microbiology and Food Preservation research unit at Ghent University (FMFP-UGent) which has a track record of elaborating challenge testing using a cocktail of 3 *L. monocytogenes* strains (LMG 23194, LMG 23192, LMG 26484; for more information on the strains refer to www.bccm.belspo.be/catalogues/lmg-catalogue-search). In addition to these 3 strains, a fourth *L. monocytogenes* strain was added to the cocktail: *L. monocytogenes* ST6 strain, isolated from frozen vegetables/production environment related to the outbreak as described in EFSA/ECDC (2018) (Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. EFSA supporting publication 2018:EN-1448. 19 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1448)
- vii. Inoculum level: in accordance to the Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods” (EU-RL Listeria, June 2014) an inoculum of ca. 100 CFU/g was used (inoculum range from 30-300 CFU/g).
- viii. Inoculation procedure: frozen vegetables (large packs) were delivered by the frozen vegetable company to the lab and stored at -18°C. Shortly after arrival, from the large frozen packs, (without defrosting) individual frozen packs of 200g were pre-weighted and packed under air in a high barrier foil and stored frozen for maximum 2 weeks before inoculation. Next, these individual pre-weighted (200 g) frozen packs were thawed overnight (in a refrigerator of 4°C) and were inoculated with 400 µl of an inoculum (ca. 1×10^5 CFU/ml) of a cocktail of the 4 selected *Listeria monocytogenes* strains (LMG 23194, LMG 23192, LMG 26484 and LFMFP 1049) to obtain an inoculum of approximately 100 CFU/g. Strains were separately cultured: first 24 hours at 37°C followed by a subculture in fresh medium incubated for 3 days at 7°C for strain LFMFP 1049 (the ST 6 strain)

isolated from frozen vegetables/production environment during the 2018 EU outbreak) and for 4 days at 7°C for the other 3 strains (during prior trial characterizing growth characteristics of the ST6 outbreak strain, it was shown to grow faster than the other 3 strains). Inoculation was performed by dripping the culture suspension on the semi-thawed (overnight at 4°C) vegetable packs. Immediately after inoculation, the inoculated 200g semi-thawed vegetable packs were closed/sealed and again put at -18°C for 14 days.

ix. **Sampling and testing:** The frozen packages were taken from the freezer and put in a refrigerator at 9°C for 24 hours to defrost (refer to temperature profile in results section). Three replicate samples were tested in parallel (test 1, test 2 and test 3). For all replicate samples (test 1, 2, 3) enumeration of *L. monocytogenes* was performed after 14 days at -18°C (day 0) and after 1 and 2 days of defrosting (24 and 48h storage in a 9±1°C refrigerator). The enumeration of *L. monocytogenes* was performed under ISO 17025 accreditation.

Note: For one of the replicate samples (test 1) the total aerobic count, lactic acid bacteria and pH were determined before inoculation, after 14 days storage at -18°C and after 1 and 2 days of defrosting (24 and 48 hours at 9°C). For all replicate samples (test 1, 2, 3) *Listeria monocytogenes* detection (presence or absence per 25g) and pH and a_w was measured on the blank sample before inoculation. The blank samples were inoculated with 400 µl diluent (Physiological saline solution).

2) Results on the categorization of vegetables

The following food characteristics were taken into account:

- Specific vegetable category
- pH (minimum and maximum)
- sugar and starch content
- Presence of anti-*Listeria* component
- Blanching
- Cut surface

pH, sugar and starch content were used to group the various specific vegetable categories in main groups. Furthermore, all products containing anti-*Listeria* components were classified in a separate group. The other characteristics such as blanching and cut surface were used to determine which vegetable type will be selected in due time for challenge testing to assess the growth potential of *L. monocytogenes* within these (main) groups.

i. Specific vegetable categories

Products were classified in eleven different categories based on the EFSA Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations) (EFSA Journal 2013, 11, 3025). Products were classified according to the 'General commodity category'. Only in a few cases was this category further split into the mentioned specific categories.

ii. Classification according to pH

pH values were obtained from a list published on PickYourOwn.org and uses following references:

- a. Anon. 1962. pH values of food products. Food Eng. 34(3): 98-99.
- b. Bridges, M. A., and Mattice, M.R. 1939. Over two thousand estimations of the pH of representative foods, American J. Digestive Diseases, 9:440-449.
- c. Warren L. Landry and et al. 1995. Examination of canned foods. FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th Ed. Chapter 21, Table 11, AOAC International, Gaithersburg, MD 20877
- d. Grahn M.A. 1984. Acidified and low acid foods from Southeast Asia. FDA-LIB

Based on the reported maximum pH of the vegetable, they were classified as follows:

- pH < 4.4: not relevant as pH is lower than the pH_{min} for challenge test according to EU Reg. 2073/2005
- 4.4 < pH < 5.0: low risk

- 5.0 < pH < 6.0: medium risk
- pH > 6.0: high risk

iii. Classification according to sugar and starch content

Sugar and starch content were based on the Belgian nutrition table (Nubel). All values were based on fresh products since for most of the vegetables, no data on nutritional composition of their frozen forms were present. Products were classified for sugar and starch content in three categories:

- Low content: < 1 %
- Medium content: between 1 and 4% for sugar; between 1 and 5% for starch
- High content: more than 4% for sugar; more than 5% for starch

iv. Classification according to presence of anti-*Listeria* component

It has been reported that *Allium* species from the *Alliaceae* family contain allicin derivative products and sulfur components which have shown antimicrobial activity (Mnayer et al., 2014). Also, carrots are reported to contain anti-*Listeria* components which have shown reduction of *L. monocytogenes* in ready-to-eat carrots during refrigerated storage (Sant' Ana et al. 2012). Products were only divided into either "no reports found" or "reports published on presence of anti-*Listeria* components" (no detailed information on the concentration of these components is known).

v. Blanching as a risk factor

Products are classified in three groups: blanched (yes), not blanched (no) or both (multiple).

Note that blanching is a technological heat treatment, the main objective being to inactivate enzymes that cause product degradation with quality loss. However, blanching can also accomplish some microbiological inactivation. The exact level of *Listeria monocytogenes* reduction will depend on the process conditions applied (time/temperature). Although blanching may cause inactivation of the pathogen, as a technological treatment, it may cause loss of texture and soften the vegetable which might facilitate growth of *L. monocytogenes* (if only mild heat treatment was used and/or the blanched product was prone to post-contamination). After discussion with the expert group, 'blanching' was not taken into account to classify the products in the different main categories because the use of a blanching step might vary for the same vegetable type across product varieties batches/producing companies

vi. Cut surface as a risk factor

Products were classified in different groups:

- Absent: intact
- Low: only one cut surface
- Medium: more than one cut surface (e.g. after peeling)
- High: shredded

If the vegetable food type appeared in more than one variety, the cut surface was classified as 'multiple'. After discussion with the expert group, these differences in cut surface were not taken into account to classify the products in the different main categories because they might vary for the same vegetable type across product varieties batches/producing companies, but this factor was used to define within one (main) group which product type to be used to perform the challenge test.

Conclusion: 4 main risk groups and selection of frozen vegetables subjected to *L. monocytogenes* challenge testing

Based on the attribution of risk classification (based upon pH, sugar & starch content and presence of anti-*Listeria* components) to the various specific categories; four main risk groups could be established

4 main groups

1.	Score 0 (contain anti- <i>Listeria</i> component)
2.	Score < 0.2
3.	Score 0.2 to < 0.35
4.	Score ≥ 0.35

The result of the scoring for the main frozen vegetables being set to the EU market is as follows.

Based on the scoring, the following frozen vegetables which belonged to the main category with the highest score (> 0.35) were selected for further *L. monocytogenes* challenge testing:

- o Sweet corn Kernels
- o Sweet Potatoes
- o Peas
- o Parsnips

In addition

- o white cabbage

was taken up for *L. monocytogenes* challenge testing. White cabbage was added to include a frozen vegetable in the 'leafy green' group and also considering the history of implication of cabbage in a *L. monocytogenes* outbreak. (Cabbage also belonged to the one but highest scoring group (Score 0.2 to < 0.35).

3) Results of growth potential of *L. monocytogenes* in frozen vegetables: the EU-RL Guideline interpretation

The growth potential of *L. monocytogenes* in three batches of the five selected vegetables defrosted at 24h & 48h at 9°C after freezing at -18°C for 14 days is shown in Table 1. It is to be noted that Day 0 is not the day of *L. monocytogenes* inoculation (this was done at day -14). Day 0 rather represents the start of defrosting, when the 200 g packs of prior *L. monocytogenes*-inoculated frozen vegetables were transferred to the refrigerator. For temperature profile during defrosting/refrigerated storage, refer to section 4.

Calculating the growth potential

According to the EU RL technical guidance document (EURL, 2019) the growth potential (log CFU/g) is defined as the difference between the median of results (three replicates) at the end of the challenge test and the median of the results at the beginning of the challenge test (three replicates). It should be noted that in some EU Member States, the national competent authorities (e.g. NVWA in the Netherlands) have decided that if the maximum difference between the three replicates at the end of shelf life is higher than 0.5 log CFU/g, not the median but the highest value of the three replicates should be taken.

Interpretation of the test results of a challenge test to assess growth potential

According to the EU RL technical guidance document (EURL, 2019), a growth potential higher than 0.5 log CFU/g indicates that the food is able to support the growth of *L. monocytogenes* during the shelf-life according to used time-temperature profile. The target value at the end of the manufacturing process should always remain 'absence in 25 g'. Depending on the growth potential that was established during challenge testing, a certain intermediate limit can be obtained (Table 2).

Table 2 Intermediate limit at the end of the manufacturing process in relation to the calculated growth potential.

Growth potential (log CFU/g) during shelf life, when products are set to the market, as determined by challenge testing	Intermediate limit at the end of the manufacturing process to prevent the pathogen exceeding 100 CFU/g at the end of shelf life
Negative or Between 0.00 and 0.49	< 100 CFU/g
Between 0.50 and 0.99	< 10 CFU/g
Between 1.00 and 1.99	< 1 CFU/g or absence per g
Between 2.00 and 2.99	Absence in 10 g
More than 3.00	Absence per 25 g

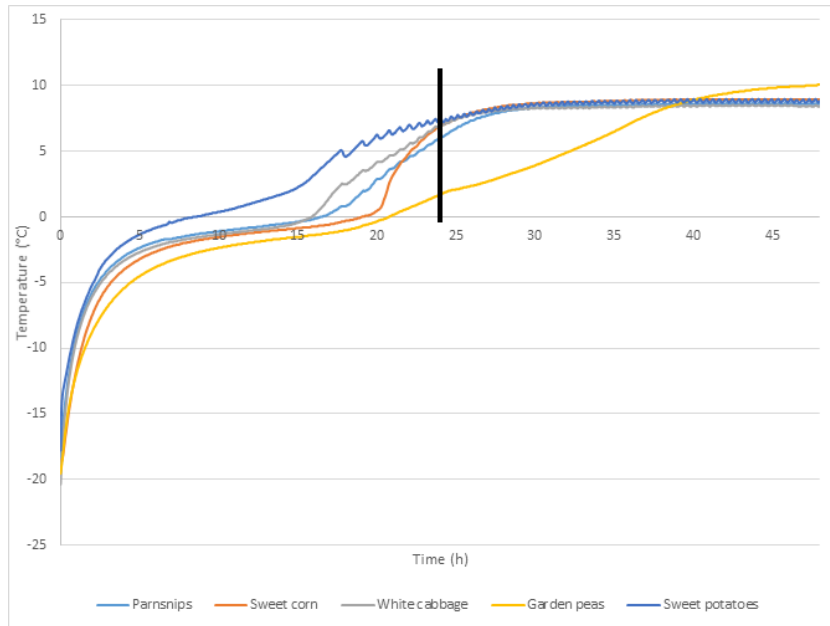
Table 1 *L. monocytogenes* growth potential after 24h & 48h defrosting in a refrigerator at 9°C

Batch 1							Growth potential Day 1		Growth potential Day 2	
vegetable	Batch	replicate	pH	Day 0	Day 1	Day 2	EU	NVWA	EU	NVWA
Garden peas	1	1	6,42	1,78	2,52	3,28	0,62	0,62	1,26	1,26
		2	6,44	2,18	2,4	3,04				
		3	6,48	1,6	2,2	2,88				
Parsnip	1	1	6,2	2,15	2,28	2,98	0,13	0,13	0,96	0,96
		2	6,11	2,28	2,23	3,11				
		3	6,12	1,7	2,32	3,11				
Sweetcorn	1	1	6,69	2	2,74	3,43	0,69	0,69	1,37	1,89
		2	6,76	2,08	2,88	3,45				
		3	6,76	2,46	2,77	3,97				
Sweet potatoes	1	1	6,09	1,6	2	3	0,89	0,97	1,76	1,97
		2	6,09	1	2,49	3,36				
		3	5,88	2,15	2,57	3,57				
White cabbage	1	1	6,04	1,6	2,04	1,6	0,44	0,44	0	0
		2	6,01	1,95	2	1,7				
		3	6,01	1,48	2,08	1,6				
Batch 2							Growth potential Day 1		Growth potential Day 2	
vegetable	Batch	replicate	pH	Day 0	Day 1	Day 2	EU	NVWA	EU	NVWA
Garden peas	2	1	6,86	1,70	3,04	2,97	0,70	0,70	0,85	0,85
		2	6,91	2,11	2,81	3,04				
		3	6,95	2,34	2,76	2,87				
Parsnip	2	1	6,27	1,60	2,76	3,71	0,85	0,85	1,71	1,71
		2	6,16	1,90	2,83	3,61				
		3	6,16	2,15	2,62	3,53				
Sweetcorn	2	1	7,4	1,60	2,88	4,20	1,10	1,10	2,35	2,38
		2	7,4	2,32	3,04	4,00				
		3	7,49	1,85	2,95	4,23				
Sweet potatoes	2	1	6,2	2,00	3,34	3,63	0,71	1,26	1,58	1,61
		2	6,21	2,20	2,78	3,69				
		3	6,14	2,08	2,79	3,66				
White cabbage	2	1	6,4	1,48	2,54	3,53	0,59	0,59	1,79	1,79
		2	6,46	2,04	2,57	4,00				
		3	6,5	1,95	2,52	3,74				
Batch 3							Growth potential Day 1		Growth potential Day 2	
vegetable	Batch	replicate	pH	Day 0	Day 1	Day 2	EU	NVWA	EU	NVWA
Garden peas	3	1	6,85	1,60	2,43	3,66	0,73	0,73	2,16	2,16
		2	6,86	1,90	2,67	3,86				
		3	6,83	1,70	2,40	3,86				
Parsnip	3	1	6,31	2,26	2,68	3,81	0,33	0,33	1,73	1,73
		2	6,3	1,85	2,41	3,99				
		3	6,33	2,08	2,41	3,81				
Sweetcorn	3	1	7,22	1,70	3,00	3,57	1,28	1,28	1,87	2,02
		2	7,25	1,70	2,98	3,51				
		3	7,23	1,85	2,94	3,72				
Sweet potatoes	3	1	6,08	1,85	2,73	3,23	0,23	0,55	1,08	1,12
		2	6,19	2,34	2,41	3,26				
		3	6,08	2,18	2,40	3,30				
White cabbage	2	1	6,41	2,04	2,54	2,93	0,50	0,50	0,80	0,80
		2	6,38	2,04	2,65	2,84				
		3	6,41	2,41	2,36	2,84				

4) Time-Temperature profiles of frozen vegetables during defrosting

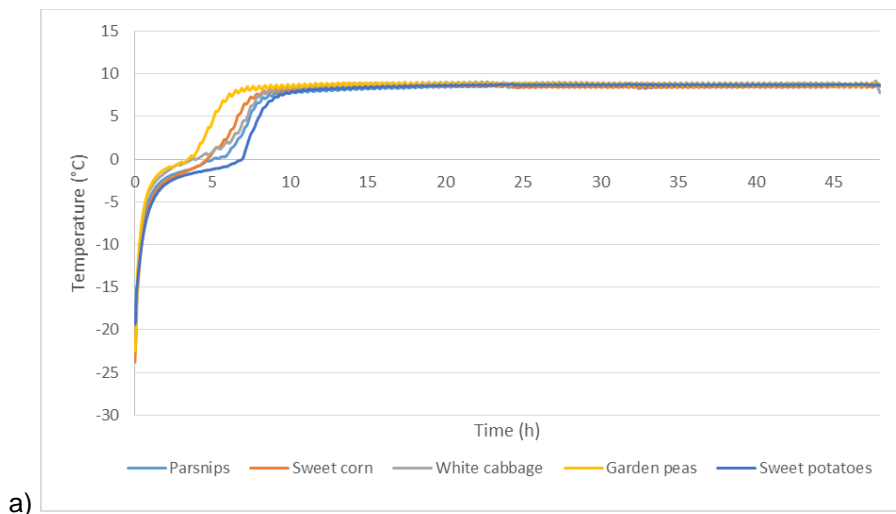
Batch 1: temperature profile (high volume loading: 11-7 kg; 5 frozen vegetables in 1 set-up)

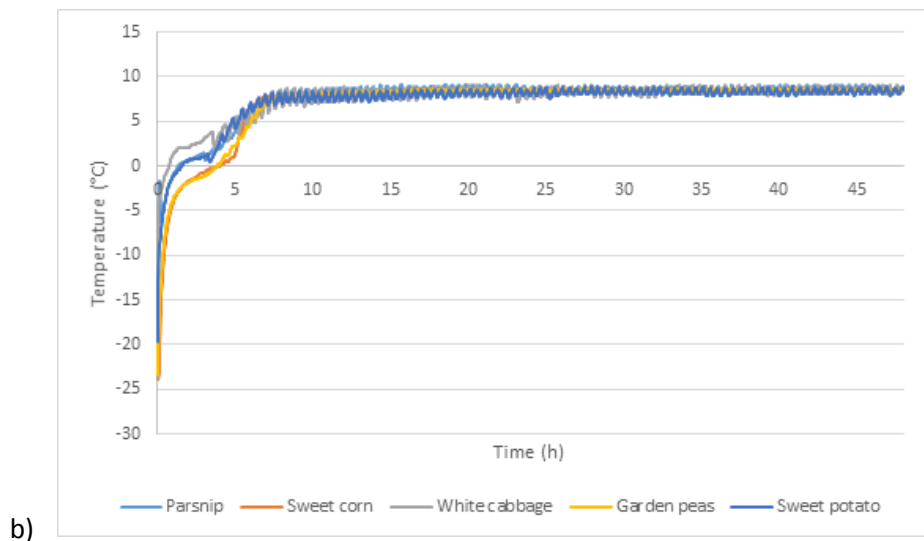
Figure 1. Measured temperature profile of a 1 x 200g pack for each type of frozen pre-cut vegetable transferred from the freezer (-18°C) to a refrigerator at 9°C during 48h residence time (Temperature recorded with i-button temperature loggers (Maxim Integrated, California, USA) (Refrigerator 331 L volume – holding in total 35-55 x 200 g packs of frozen pre-cut vegetables) = scenario 1 (high volume loading simulating defrosting in catering or business to business refrigerator scenario)



Batch 2 and 3: temperature profile (low volume loading: 1,4-2,2 kg; 1 set-up per frozen vegetable type)

Figure 2. Measured temperature profile of a 1 x 200g pack for each type of frozen pre-cut vegetable transferred from the freezer (-18°C) to a refrigerator at 9°C during 48h residence time (Temperature recorded with ibutton temperature loggers (Maxim Integrated, California, USA) a) Batch 2 temperature profiles and b) Batch 3 temperature profiles (Refrigerator 331 L volume – holding in total 7-11 x 200 g packs of frozen pre-cut vegetables) = scenario 2 (low volume loading simulating defrosting in household refrigerators scenario)





Focus on temperature profile (time (t)-temperature (T) recordings for (uninoculated) sweet corn in two conditions of defrosting (high volume loading versus low volume loading))

As it was noted that it took a prolonged time to defrost the frozen vegetable packs upon high volume loading (batch 1) (temperatures > 0°C achieved after > 18h) the temperature profile of an alternative scenario of defrosting (low volume loading) was explored, which was considered more representative of ‘household’ defrosting/refrigeration condition. In this alternative scenario, a total 10 frozen (-18°C) packs of 200g were taken from the freezer and put into a hitherto empty refrigerator at 9°C (2 pack per refrigerator ‘level’ i.e. top, intermediate-above, middle, intermediate-under, under). A 10-pack loading in one refrigerator allowed individual packs of all replicates (and blanks) that were part of a one batch *L. monocytogenes* challenge test of one selected food category to be put together. The recorded temperature profile for 9 of these 10 packs (200g each = 2 kg of defrosting frozen sweet corn) in the refrigerator is shown in Figure3.

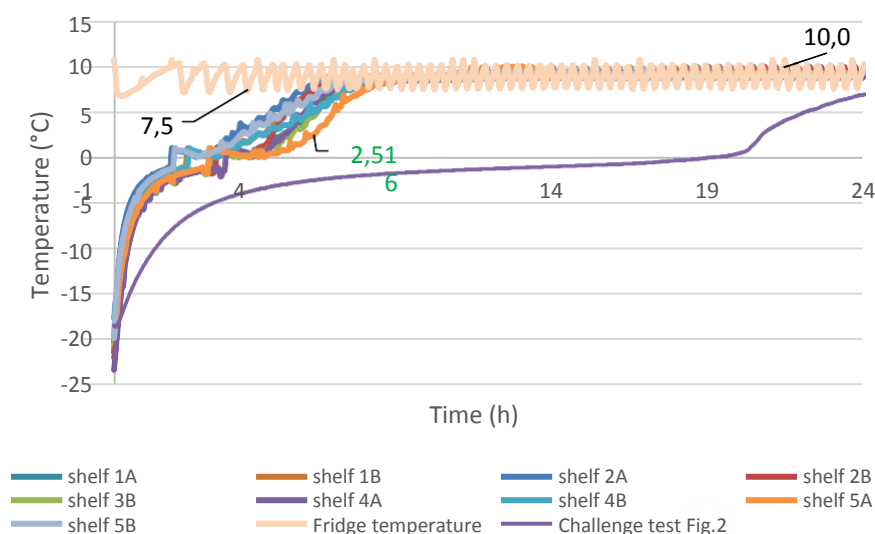


Figure 3. Measured temperature profile of 9 out of 10 x 200g defrosting frozen packs of sweet corn (2 kg or 2000 g of defrosting frozen sweet corn in total) transferred from the freezer (-18°C) into an (otherwise empty) refrigerator at 9°C during 48h residence time (Temperature recorded with i-button temperature loggers (Maxim Integrated, California, USA) (Refrigerator 331 L volume – holding in total 10 x 200 g packs of frozen sweet corn) (the yellow line labelled ‘Challenge test’ refers to Batch 1 scenario 1 high volume loading temperature profile)

These time-temperature profiles show that this type of '*L. monocytogenes* challenge testing' to assess the behaviour of *L. monocytogenes* during defrosting/refrigerated storage of frozen vegetables under reasonably foreseen conditions at consumer's home does not correspond to a 'standard' Challenge test for *L. monocytogenes*' as described in the EU-RL Guidance for challenge testing (EURL Lm Version 3 – Amd 1 dd 21 February 2019).

The EU-RL guidance was originally set-up for *L. monocytogenes*' challenge testing of pre-packed refrigerated foods with a prolonged shelf life (> 5 days) under refrigeration (the main @risk products for *L. monocytogenes*) i.e. the type of foods which are produced and set on the market as 'refrigerated' foods (e.g. refer to the foods analysed in the EU-wide Baseline study of *L. monocytogenes* in foods namely smoked fish, cooked meat products, (soft) cheese or also deli-salads etc).

The findings of the present study on *L. monocytogenes* challenge testing in defrosting vegetables deviates from the 'standard' Challenge test for *L. monocytogenes*' as described in the EU-RL Guidance because

- 1) there is no 'uniform' product temperature BUT a 'variable' temperature profile, which will be impacted by:
 - i) the type/volume of refrigerator (and possibly also the remaining load of the refrigerator with other cold foods) and
 - ii) the 'amount' of 'defrosting food' (N° of packs and possibly also the 'weight' of the individual defrosting packs, position in the refrigerator etc.)
- 2) there is no 'prolonged' shelf life testing but a reasonably to foreseen 'consumer handling' testing of defrosting (up to 24h to max. 48h) in a refrigerator (at 'reasonably to foreseen' temperature abuse i.e. set at 9°C whereas usual food safety agencies or competent authorities throughout EU recommend consumer refrigerators to be set at max. 5°C) (e.g. refer to <https://www.food.gov.uk/safety-hygiene/chilling>)

5) Discussion of *L. monocytogenes* growth potential during defrosting/refrigerated storage of frozen vegetables

It is clear that although PRPs, HACCP and a well implemented FSMS is in place – as stipulated by the PROFEL hygiene guidelines – it can be expected that for this type of production process of quick-frozen vegetables an occasional (post-)contamination can still occur and thus it cannot be excluded, and it has been noted from sector-wide microbiological analysis of quick-frozen vegetables, that some quick-frozen products set to the retail market as frozen foods might be occasionally contaminated with low levels of *L. monocytogenes* (< 10 CFU/g).

Although the majority of the frozen vegetables is not meant to and is not used as ready-to-eat (RTE), in order to ensure the *L. monocytogenes* safety limit of max. 100 CFU/g at the time of consumption for (RTE) foods on the market, the time for defrosting (in a refrigerator) or refrigerated storage of frozen vegetable packs should not support more than 1 log₁₀ unit as otherwise an accidental low level *L. monocytogenes* contamination (of < 10 CFU/g) could exceed 100 CFU/g at the time of use and consumption of these frozen vegetables by the consumer.

Overall the *L. monocytogenes* growth potential observed after 24h is restricted to less than 1 log₁₀, except for frozen corn (Batch 2 and Batch 3) and except for one of the replicates (of Batch 2) of frozen sweet potatoes.

If refrigerated storage is prolonged with an additional 24h (up to 48h thus), often the outgrowth of *L. monocytogenes* on the defrosted refrigerated vegetables exceeds more than 1 log₁₀ and quite some variability in the extent of *L. monocytogenes* is observed between the batch. This observed inter-batch variability (and also noted intra-batch variability) can be attributed to several factors. Indeed, they were different batches (derived from different producing companies as well) from the same type of frozen vegetable which can differ slightly in product characteristics. Furthermore, variability was noted in the measured 'temperature profile recorded' (e.g. Figure 3 in multiple blank samples of sweet corn) and hence some variable temperature profile between packs simultaneously defrosting in a single refrigerator was expected to occur as well. This might also affect to some extent the outgrowth and thus the observed growth potential of *L. monocytogenes* inter-batch and intra-batch.

As mentioned above, from the results of the *L. monocytogenes* section shown in Table 1 (section 3) it became clear that sweet corn is the most susceptible to support growth of *L. monocytogenes*, and also may support outgrowth of more than 1 log₁₀ within the 24h defrosting/storage time in the most facilitating conditions (reaching temperatures > 0°C in 2-5h) as was observed in Batch 2 and 3 (refer to Table 3 for a summary of *L. monocytogenes* growth potential on sweet corn). It was noted in a preliminary trial to characterise the growth of LFMFP 1049 (the ST 6 strain isolated from frozen vegetables/production environment during the 2018 EU outbreak) that this latter strain grew faster than the other 3 strains at 7°C. Therefore, an extra challenge test was performed for Batch 3 of sweet corn using now a cocktail of the standard three *L. monocytogenes* strains (and thus without the expected faster growing ST6 strain). It was noted (refer to Table 3) that the *L. monocytogenes* growth potential as determined in the latter case was indeed restricted to less than 1 log₁₀ unit within the first 24h storage at 9°C. Thus, the inclusion of the ST 6 strain isolated from frozen vegetables/production environment during the 2018 EU outbreak might also explain to some extent the noted increased (more than 1 log₁₀ within the 24h defrosting/storage time) growth of *L. monocytogenes* in the sweet corn.

Table 3: Summarized results of of *L. monocytogenes* growth potential on sweet corn

vegetable	Batch	EU	NVWA	EU	
	NVWA Swc	0,69	0,69	1,37	1,89
Sweetcorn	2*	1,10	1,10	2,35	2,38
Sweetcorn	3*	1,28	1,28	1,87	2,02

*challenge test performed with 4 *L. monocytogenes* strains (in batch 1-2-3)

i.e. including the *L. monocytogenes* ST6 strains isolated from the EU 2018 frozen corn outbreak

° temperature profile in Batch 1 deviated (during defrosting longer time to reach > 0°C)

vegetable	Batch	Growth potential Day 1		Growth potential Day 2	
		EU	NVWA	EU	NVWA
Sweet corn	3**	0,62	0,62	1,33	1,33

**challenge test performed using Batch 3 but with 3 *L. monocytogenes* strains instead of 4 test strains

i.e. without the *L. monocytogenes* ST6 strains isolated from the EU 2018 frozen corn outbreak

In conclusion, the knowledge established by challenge testing as described above on the behaviour and growth potential of *L. monocytogenes* during defrosting/refrigerated storage of frozen vegetables was used as an input to 1) establish *L. monocytogenes* end product specification and 2) develop appropriate risk communication to consumers via the label as described in the hygiene guidance in Section 5.2.

References for Annex III:

Mnayer, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Petitcola, E., Hamieh, T., Nehme, N., Ferrant, C., Fernandez, X. and Chemat, F. (2014). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essentials oils from the Alliaceae Family. *Molecules*, 19, 20034-20053.

Noriega, E., Newman, J., Siggers, E., Robertson, J., Laca, A., Diaz, M., Brocklehurst, T.F. (2010). Anti-Listerial activity of carrots: effect of temperature and properties of different carrot fractions. *Food Research International*, 43, 2425-2431.

Sant’Ana, A.S., Barbosa, M.S., Destro, M.T., Landgraf, M., Franco, B.D.G.M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* 157,52-58.