



EURL Lm

Laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds.
Listeria monocytogenes
<http://eurl-listeria.anses.fr>

DOKUMENT DOTYCZĄCY WYTYCZNYCH TECHNICZNYCH EURL *Lm*

**w sprawie testów obciążeniowych i badań trwałości dla oceny
trwałości żywności gotowej do spożycia związanej z *Listeria
monocytogenes***

Wersja 4 z dnia 1 lipca 2021

Hélène Bergis, Ludivine Bonanno, Adrien Asséré, Bertrand Lombard, Laboratorium Referencyjne UE ds.
Listeria monocytogenes Anses - Laboratorium Bezpieczeństwa Żywności, Maisons-Alfort, Francja

We współpracy z grupą roboczą złożoną z przedstawicieli krajowych laboratoriów referencyjnych (NRL) ds.
Listeria monocytogenes i właściwy organ (CA):

- Marie Polet, Sciensano (NRL), Belgia;
- Jens Kirk Andersen, Narodowy Instytut Żywności (NRL), Dania;
- Bernadette Hickey, Food Microbiology Division, Department of Agriculture, Food and Marine (NRL), Republika Irlandii;
- Francesco Pomilio, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (NRL), Włochy;
- Paul in't Veld, Charlotte Verbart, Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA), (CA and c/o NL-NRL), Holandia;
- Taran Skjerdal, Norweski Instytut Weterynaryjny (NRL), Norwegia;
- Gail Betts, Campden BRI (c/o UK-NRL), Zjednoczone Królestwo.

SPIS TREŚCI

| | |
|--|----|
| Przedmowa | 5 |
| 1 Wstęp | 6 |
| 1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> | 6 |
| 1.2 Kontekst legislacyjny | 8 |
| 1.3 Wytyczne UE | 8 |
| 2 Zakres | 9 |
| 3 Odniesienia normatywne | 12 |
| 4 Definicje | 13 |
| 4.1 Żywność gotowa do spożycia (RTE) | 13 |
| 4.2 Okres przydatności do spożycia żywności RTE | 13 |
| 5 Rola FBO i laboratorium | 14 |
| 6 Test sprawdzający | 15 |
| 6.1 Warunki wstępne przed rozpoczęciem testu na wyzwanie | 15 |
| 6.2 Test obciążeniowy oceniający potencjał wzrostu | 17 |
| 6.2.1 Wstęp | 17 |
| 6.2.2 Protokół badania obciążeniowego w celu oceny potencjału wzrostu | 18 |
| 6.2.2.1 Wybór partii | 18 |
| 6.2.2.2 Wybór szczepów | 19 |
| 6.2.2.3 Przygotowanie inokulum | 19 |
| 6.2.2.4 Inokulacja jednostek badanych | 19 |
| 6.2.2.5 Liczba jednostek - Liczba punktów poboru próbek | 21 |
| 6.2.2.6 Warunki przechowywania | 21 |
| 6.2.2.7 Pomiar parametrów fizykochemicznych | 22 |
| 6.2.2.8 Analizy mikrobiologiczne | 24 |
| 6.2.2.9 Obliczanie potencjału wzrostu | 25 |
| 6.2.2.10 Zastosowanie wyników | 27 |
| 6.2.2.11 Sprawozdanie z badania | 28 |

| | | |
|----------|---|----|
| 6.3 | Test obciążeniowy oceniający maksymalne tempo wzrostu..... | 29 |
| 6.3.1 | Wstęp..... | 29 |
| 6.3.2 | Protokół testu obciążeniowego w celu oceny maksymalnego tempa wzrostu..... | 29 |
| 6.3.2.1 | Liczba partii..... | 29 |
| 6.3.2.2 | Wybór szczepów..... | 30 |
| 6.3.2.3 | Przygotowanie inokulum..... | 30 |
| 6.3.2.4 | Inokulacja jednostek badanych..... | 30 |
| 6.3.2.5 | Liczba jednostek - Liczba punktów poboru próbek..... | 31 |
| 6.3.2.6 | Warunki przechowywania..... | 31 |
| 6.3.2.7 | Analizy mikrobiologiczne..... | 31 |
| 6.3.2.8 | Obliczanie maksymalnego wskaźnika wzrostu..... | 31 |
| 6.3.2.9 | Zastosowanie wyników..... | 32 |
| 6.3.2.10 | Sprawozdanie z badania..... | 35 |
| 7 | Badanie trwałości..... | 36 |
| 7.1 | Wstęp..... | 36 |
| 7.2 | Protokół badania trwałości..... | 36 |
| 7.2.1 | Opis badanej żywności RTE..... | 37 |
| 7.2.2 | Pobieranie próbek żywności..... | 37 |
| 7.2.3 | Przechowywanie próbek..... | 37 |
| 7.2.4 | Analizy mikrobiologiczne..... | 37 |
| 7.2.5 | Wyniki..... | 38 |
| 7.2.6 | Sprawozdanie z badań..... | 40 |
| 8 | Odniesienia..... | 41 |
| 9 | Definicje..... | 43 |
| 10 | Załączniki..... | 44 |
| 10.1 | Tabela przedstawiająca korzyści/ograniczenia testów obciążeniowych oceniających potencjał wzrostu, maksymalne tempo wzrostu oraz badań trwałości..... | 44 |
| 10.2 | Schemat blokowy ustalania i weryfikacji okresu przydatności do spożycia żywności gotowej do spożycia w odniesieniu do <i>Listeria monocytogenes</i> | 45 |
| 10.3 | Wykaz parametrów charakteryzujących produkt, które mają wpływ na wzrost <i>Lm</i> | 46 |

| | | |
|-------|--|----|
| 10.4 | Schemat przepływu opisujący schematycznie etapy od danych historycznych FBO do badania w laboratorium | 47 |
| 10.5 | Zestaw szczepów <i>L. monocytogenes</i> z ich charakterystyką wzrostu | 48 |
| 10.6 | Przykład przygotowania inokulum do testu obciążeniowego..... | 49 |
| 10.7 | Kilka przykładów technik zanieczyszczania | 51 |
| 10.8 | Przykłady dotyczące całkowitej liczby jednostek wymaganych do przeprowadzenia testu sprawdzającego oceniającego potencjał wzrostu..... | 53 |
| 10.9 | Przykład wpływu temperatury przechowywania na okres przydatności do spożycia | 55 |
| 10.10 | Wykorzystanie kalkulatora FSSP do obliczania WPS i obliczania a_w | |
| 10.11 | Przykłady zastosowania kwasów organicznych jako konserwantów żywności | 57 |
| 10.12 | Pomiar atmosfery gazowej w celu sprawdzenia szczelności opakowania..... | 58 |
| 10.13 | Przykład przygotowania zawiesiny wyjściowej | 58 |
| 10.14 | Przykłady dotyczące całkowitej liczby jednostek wymaganych do testu na wyzwanie oceniającego maksymalne tempo wzrostu..... | 59 |
| 10.15 | Pojedyncze losowe pobieranie próbek | 60 |

Przedmowa

Niniejszy dokument jest czwartą wersją wytycznych technicznych (TGD) Laboratorium Referencyjnego Unii Europejskiej ds. *Listeria monocytogenes* (EURL *Lm*) dotyczących testów obciążeniowych i badań trwałości w celu oceny trwałości żywności gotowej do spożycia pod kątem *Listeria monocytogenes*. Zastępuje on wersję trzecią z dnia 6 czerwca 2014 roku - Zmiana 1 z dnia 21 lutego 2019 roku.

Pierwsza wersja niniejszej TGD (2008) została opracowana na wniosek Dyrekcji Generalnej ds. Zdrowia i Konsumentów (DG SANCO) Komisji Europejskiej (KE) w odpowiedzi na zgłaszane przez państwa członkowskie UE zapotrzebowanie na dokument zawierający zarówno szczegółowe, jak i praktyczne informacje na temat sposobu prowadzenia badań dotyczących okresu przydatności do spożycia *Listeria monocytogenes* (*Lm*) w żywności gotowej do spożycia (RTE) w celu zapewnienia zgodności z kryteriami mikrobiologicznymi określonymi w art. 3.2 rozporządzenia (WE) nr 2073/2005.

Celem tej rewizji jest zapewnienie spójności pomiędzy Wytycznymi Technicznymi EURL *Lm* a normą EN ISO 20976-1 „Wymagania i wytyczne dotyczące przeprowadzania testów obciążeniowych żywności i produktów paszowych - Część 1: testy obciążeniowe mające na celu badanie potencjału wzrostu, czasu opóźnienia i maksymalnej szybkości wzrostu” opublikowaną w 2019 r.

Norma określa protokoły przeprowadzania testów obciążeniowych dla badań wzrostu dla wszelkich bakterii i drożdży, które nie tworzą grzybni, podczas gdy Wytyczne Techniczne EURL *Lm* obejmują aspekty techniczne specyficzne dla *Lm* w żywności RTE, które nie zostały uwzględnione w normie. Dlatego też Wytyczne Techniczne EURL *Lm* powinny być obecnie odczytywane w połączeniu z normą i traktowane jako dokument uzupełniający do normy EN ISO 20976-1.

W rewizji niniejszej TGD uwzględniono również doświadczenia zdobyte na przestrzeni lat w zakresie przeprowadzania testów obciążeniowych.

Niniejszy dokument pozostaje uzupełnieniem dokumentu EC/DG SANCO, zatytułowanego „Wytyczne dotyczące badań trwałości *Listeria monocytogenes* dla żywności gotowej do spożycia, zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych”.

Czwarta wersja TGD została przygotowana przez EURL *Lm* wraz z grupą roboczą złożoną z sześciu krajowych laboratoriów referencyjnych i została zatwierdzona przez Stały Komitet ds. Roślin, Zwierząt, Żywności i Pasz w dniu 1 lipca 2021 r.

1 Wstęp

1.1 *Listeria monocytogenes*

Rodzaj *Listeria* składa się obecnie z 20 gatunków, w tym *Listeria monocytogenes* - bakterii chorobotwórczej, która może wywoływać chorobę zwaną listeriozą, która może dotyczyć ludzi i wielu gatunków zwierząt.

Mikroskopowo *Lm* wygląda jak mała gram-dodatnia pałeczka (0,5-2 μm x 0,5 μm), występująca pojedynczo lub w krótkich łańcuchach, ruchliwa w temp. 20-25°C i nietworząca zarodników. Jest tlenowa i fakultatywnie beztlenowa, katalazo-dodatnia z wyjątkiem kilku rzadkich szczepów, oksydazo-dodatnia i eskulina-dodatnia. *Listeria* fermentuje wiele węglowodanów bez wytwarzania gazu. Szczepy *Lm* nie reagują na D-ksylozę i wytwarzają lecytynazę. Są one na ogół β -hemolizujące i L-rhamnozo-dodatnie.

Lm jest zróżnicowany genetycznie: Szczepy klasyfikowane są do czterech linii ewolucyjnych (I-IV), 13 serotypów (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e i 7) na podstawie konwencjonalnego serotypowania (antygeny somatyczne i flagellarne) oraz 4 głównych serogrup molekularnych (IIa., IIb, IIc i IVb) na podstawie testów PCR.

Historycznie serotyp 4b (serogrupa IV b) był najczęściej występującym serotypem w przypadkach klinicznych u ludzi i był rzadziej odzyskiwany z żywności. Jednak w ciągu ostatniej dekady serotyp 1/2a (serogrupa IIa) był najczęściej występującym serotypem w próbkach żywności i próbek środowiskowych, i był często łączony z chorobami u ludzi, powodując znaczące ogniska w Europie i Ameryce Północnej.

W ostatnim czasie w badaniach nad ogniskami epidemii odchodzi się od stosowania elektroforezy pulsacyjnej (PFGE), uważanej wcześniej za „złoty standard” typowania bakterii, na rzecz typowania metodą sekwencjonowania całego genomu (WGS), która ma większą moc dyskryminacyjną w porównaniu z PFGE (Gillesberg Lassen i in., 2016).

Duże badania typowania przeprowadzone metodą MLST (Multi Locus Sequence Typing) ujawniają, że populacja *Lm* jest w dużej mierze klonalna. Większość szczepów jest skupiona w kilku ważnych Kompleksach Klonalnych (CC), które są definiowane jako grupy izolatów wykazujących typy sekwencji (ST). Obecnie, CC i ST są systematycznie wykorzystywane do klasyfikacji populacji szczepów.

Hiperwirulentne i hipowirulentne CC zostały wyodrębnione poprzez połączenie podejścia epidemiologicznego, klinicznego i eksperymentalnego (Maury i in., 2016). Szczepy CC1, CC2, CC4, CC6 (linia I) odpowiadały za większość ognisk listeriozy i sporadycznych przypadków u ludzi i zwierząt. Inne CC, takie jak CC9, CC121 (linia II) są częściej izolowane u pacjentów z obniżoną odpornością. Te CC są nadreprezentowane w żywności, rozpowszechnione we wszystkich sektorach żywności (Felix i in., 2018) i zdolne do przetrwania przez wiele lat w różnych środowiskach przetwarzania żywności. Oczekuje się jednak, że WGS dostarczy w przyszłości głębszej i bardziej zniuansowanej wiedzy w tym obszarze.

Lm jest wszechobecną, telluryczną bakterią, szeroko rozpowszechnioną w środowisku. Jest bakterią psychrotroficzną, zdolną do wzrostu w temperaturach chłodniczych (tab. 1).

Tabela 1: Charakterystyka wzrostu/odżywalności *L. monocytogenes* (specyficzna dla szczepu) w podłożu bulionowym

| | Min. (dolna granica wzrostu) | Wzrost optymalny (najszybszy wzrost) | Max. (górną granicę wzrostu) | Przetrwanie (ale bez wzrostu) |
|-------------------------|--|---|---|---|
| Temperatura (°C) | -2 | 30 - 37 | 45 | -18 |
| pH | 4.0 - 4.3 | 7.0 | 9.6 | 3.3 - 4.2 |
| aw | 0.92 (0.90 z glicerolem) | 0.99 | / | <0.90 |
| Zawartość NaCl | | | 12 | ≥20 |
| Atmosfera gazu | Fakultatywnie beztlenowe i mikroaerofilne (zdolne do wzrostu w obecności/braku O ₂ . (np. w próżni lub atmosferze modyfikowanego gazu)) | | | |

Źródła: Charakterystyka wzrostu *Lm* odnosi się do Anses datasheet on biological hazards "*Listeria monocytogenes*", 2020, a charakterystyka przeżywalności *Lm* odnosi się do EC/DG SANCO Wytyczne dotyczące badań nad *Listeria monocytogenes* w okresie przydatności do spożycia w odniesieniu do żywności gotowej do spożycia, zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych".

L. monocytogenes jest zazwyczaj przenoszony, gdy żywność jest zbierana, przetwarzana, przygotowywana, pakowana, transportowana lub przechowywana w środowisku skażonym *Lm*. Większość gotowych do spożycia produktów spożywczych jest podatna na skażenie *Lm*, ale tylko te, w których *Lm* może przetrwać i/lub rosnąć są potencjalną przyczyną listeriozy. Transmisja przez żywność jest zdecydowanie najważniejszą (99% przypadków) drogą przenoszenia choroby na człowieka. Po spożyciu żywności skażonej *Lm*, u ludzi może rozwinąć się listerioza.

Listerioza występuje zarówno w postaci inwazyjnej (matczyno-neonatalnej i niemaczyno-neonatalnej), jak i nieinwazyjnej (żołądkowo-jelitowej) (tab. 2).

Tabela Rodzaje2. listeriozy i objawy

| Rodzaj listeriozy | Czas inkubacji | Główne objawy | Wpływ na zdrowie |
|-----------------------------|---|---|---|
| Postać matczyno-neonatalna | 17 do dni67 mediana: dni28 | - Zespół grypopodobny (gorączka...) - Spontaniczna aborcja - Śmierć in utero, wcześniactwo - Zakażenie noworodka | 20% do 30% śmiertelność u noworodków |
| Formy niemaczyno-neonatalne | Postać bakteriemiczna: 1 do 12 dni mediana: 2 dni Postać oponowo-nerwowa: do 214 dni mediana: dni9 | - Posocznica - Zapalenie opon mózgowych, meningo /Rhombencephalitis, | Następstwa neurologiczne Śmiertelność od 20% do 30%. |
| Postać żołądkowo-jelitowa | 6 godziny do 4 dni mediana: godziny24 | - Gorączka - Nudności, wymioty, biegunka | |

Źródła: Arkusz danych Anses dotyczący zagrożeń biologicznych "*Listeria monocytogenes*", 2020

Inwazyjna listerioza jest cięższą postacią choroby i dotyka szczególnie pewne grupy ludności wysokiego ryzyka. Należą do nich kobiety w ciąży i ich noworodki, osoby starsze oraz osoby z osłabionym układem odpornościowym.

1.2 Kontekst legislacyjny

Rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych ustanawia przepisy, które muszą być przestrzegane przez przedsiębiorstwa sektora spożywczego (FBO), i określa kryteria mikrobiologiczne dla niektórych mikroorganizmów.

W załączniku I do niniejszego rozporządzenia określono mikrobiologiczne kryteria bezpieczeństwa żywności mające zastosowanie do *Lm* w żywności RTE (kryteria 1.1-1.3), przy czym kryterium 1.1 dotyczy w szczególności żywności RTE przeznaczonej dla niemowląt i specjalnego przeznaczenia medycznego, a pozostałe dwa kryteria (1.2 i 1.3) dotyczą wszystkich pozostałych rodzajów żywności RTE. Limit ilościowy wynoszący jtk/g100 został określony w rozporządzeniu 2073/2005 dla kryterium (1.3 żywność RTE niezdolna do podtrzymywania wzrostu *Lm*) oraz dla kryterium (1.2 żywność RTE zdolna do podtrzymywania wzrostu *Lm*), jeżeli producent jest w stanie wykazać w sposób zadowalający dla właściwego organu, że jego produkt nie przekroczy limitu 100 jtk/g w ciągu całego okresu przydatności do spożycia.

Artykuł 3 ust. 2 i załącznik II do niniejszego rozporządzenia stanowią, że podmioty prowadzące przedsiębiorstwa spożywcze przeprowadzają, w razie konieczności, badania w celu oceny wzrostu *Lm*, które mogą być obecne w produkcie, w okresie przydatności do spożycia w racjonalnie przewidywalnych warunkach przechowywania.

1.3 Wytyczne UE

Dokument EC/DG SANCO, zatytułowany „Wytyczne dotyczące badań trwałości *Lm* dla żywności gotowej do spożycia, zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych”, jest skierowany do podmiotów prowadzących działalność gospodarczą, które produkują żywność gotową do spożycia i może być wykorzystywany przez właściwe organy (CA) do weryfikacji poprawności przeprowadzania badań dotyczących okresu przydatności do spożycia przez podmioty prowadzące działalność gospodarczą.

Celem niniejszego dokumentu jest udzielenie wskazówek podmiotom prowadzącym działalność gospodarczą w zakresie produkcji żywności gotowej do spożycia w zakresie identyfikacji ryzyka występowania *Lm* w ich produktach oraz sposobu postępowania w celu wykazania, w sposób zadowalający dla właściwego organu, że ich produkty nie przekroczą kryterium ilościowego (1.2a i 1.3 rozporządzenia (WE) nr 2073/2005) w ciągu całego okresu przydatności do spożycia. Drzewo decyzyjne przedstawiające schematyczne podejście do etapów badań dotyczących okresu przydatności do spożycia wskazuje podmiotom sektora spożywczego, kiedy konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań szczegółowych w celu zbadania wzrostu *Lm* w produkcji.

Dokument „Wytyczne EURL *Lm* do oceny kompetencji laboratoriów wykonujących testy obciążeniowe i badania trwałości związane z *Listeria monocytogenes* w żywności gotowej do spożycia” jest przeznaczony do stosowania przez właściwe organy i krajowe laboratoria referencyjne, jeśli są one do tego upoważnione przez swoje właściwe organy. Celem tych wytycznych jest ustanowienie zharmonizowanego podejścia do tego, w jaki sposób laboratoria powinny przeprowadzać testy obciążeniowe oraz jak oceniać kompetencje laboratoriów w zakresie prowadzenia badań trwałości związanych z *Lm*. Został on przygotowany przez EURL *Lm* we współpracy z przedstawicielami krajowych laboratoriów referencyjnych dla *Lm* (NRL *Lm*) i właściwych organów.

2 Zakres

- Wytyczne techniczne EURL *Lm* (TGD) należy czytać w połączeniu z normą EN ISO 20976-1 „Wymagania i wytyczne dotyczące prowadzenia testów obciążeniowych żywności i produktów paszowych - Część 1: testy obciążeniowe mające na celu zbadanie potencjału wzrostu, czasu opóźnienia i maksymalnej szybkości wzrostu”.

Norma EN ISO 20976-1 określa protokół przeprowadzania testów obciążeniowych dla wszelkich bakterii lub drożdży, które nie tworzą grzybni, a dokument Wytyczne techniczne EURL *Lm*, jako dokument uzupełniający, podaje specyfikacje dotyczące *Lm*. Zawiera on szczegółowe sekcje, które należy uwzględnić przy ocenie trwałości żywności gotowej do spożycia w odniesieniu do *Lm*.

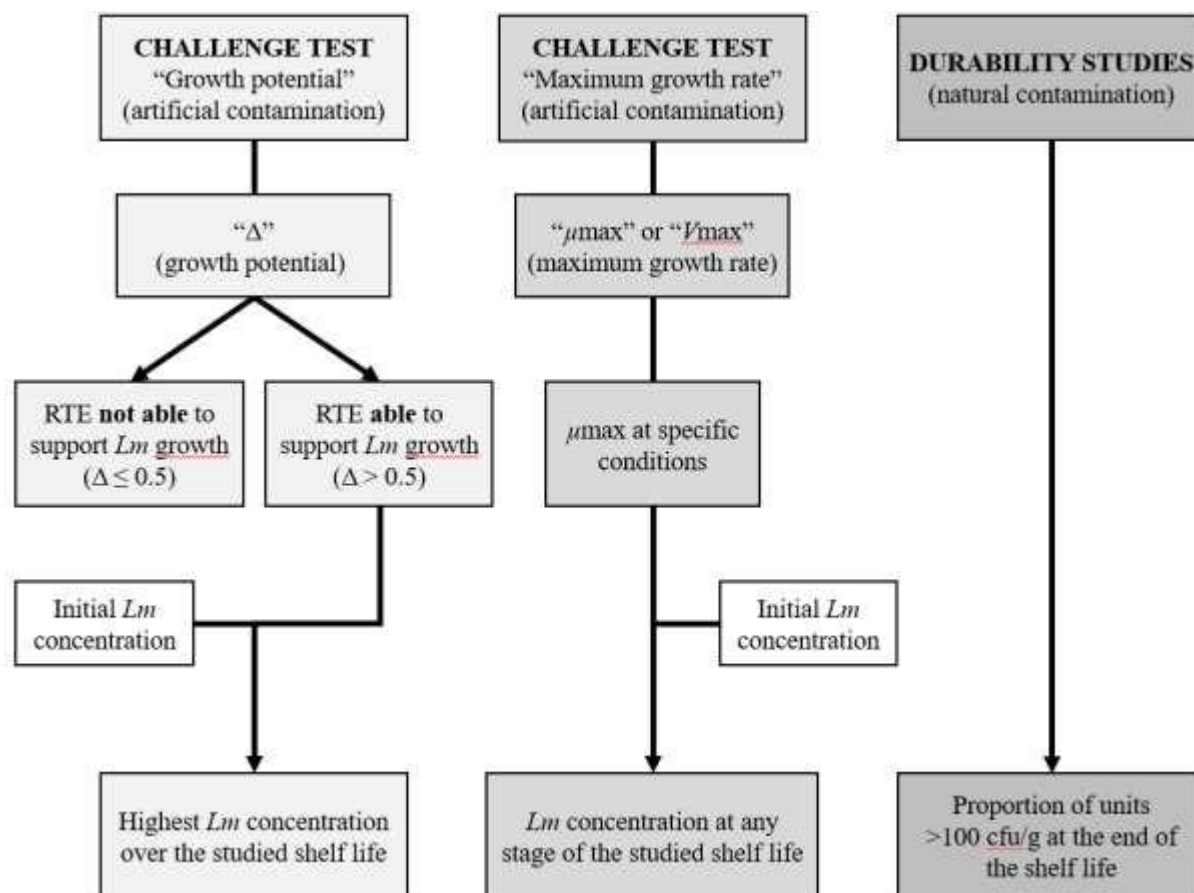
Niniejszy dokument zawiera wytyczne dotyczące sposobu przeprowadzania badań określonych w załączniku II do rozporządzenia (WE) 2073/2005, które można wdrożyć w celu oceny trwałości żywności RTE w odniesieniu do *Lm*:

- (1) Testy obciążeniowe (test obciążeniowy w celu określenia potencjału wzrostu i test obciążeniowy w celu określenia maksymalnego tempa wzrostu);
 - (2) Badania trwałości.
- Badania obciążeniowe mają na celu potwierdzenie trwałości produktu spożywczego w danych warunkach przechowywania poprzez dostarczenie informacji na temat zachowania się *Lm* (wzrost, przeżywalność lub spadek) po sztucznym zaszczepieniu. W badaniach obciążeniowych uwzględnia się zmienność partii, próbek żywności i szczepów. Poziom skażenia, niejednorodność skażenia oraz stan fizjologiczny bakterii jest trudny do naśladowania w badaniu obciążeniowym. Dlatego też metoda skażenia nie zawsze może w pełni naśladować skażenie naturalne.
 - Badania trwałości mają na celu sprawdzenie okresu przydatności do spożycia produktu spożywczego w danych warunkach przechowywania. Badania trwałości oceniają wzrost lub przeżywalność *Lm*, które mogą być naturalnie obecne w żywności w okresie jej przydatności do spożycia, w racjonalnie przewidywalnych warunkach dystrybucji, przechowywania i stosowania.

Nawet jeśli badania trwałości można uznać za bardziej realistyczne niż test obciążeniowy, ponieważ zanieczyszczenie występuje w sposób naturalny, ich zastosowanie w walidacji jest ograniczone. Ze względu na niską częstość występowania *Lm*, niski poziom zanieczyszczenia *Lm* i jego niejednorodne rozmieszczenie w żywności nie zaleca się przeprowadzania badań trwałości w celu zatwierdzenia okresu przydatności do spożycia związanego z *Lm*. Ich zastosowanie jest bardziej odpowiednie do weryfikacji okresu przydatności do spożycia.

- Wybór badania(-ań), które ma być wykonane, powinien być dokonany przez FBO, jeśli to konieczne przy współpracy z właściwym laboratorium, które będzie je przeprowadzać. Wybór powinien być oparty na informacjach, które mają być uzyskane, jak pokazano na rys. 1.

Na rysunku 1 przedstawiono możliwe rodzaje badań określających wzrost *Lm* w żywności RTE oraz wyniki uzyskane w każdym z nich.



Rysunek1. Wyniki uzyskane w każdym rodzaju badania

Tabela przedstawiająca korzyści i ograniczenia każdego rodzaju badania znajduje się w załączniku. 10.1.

TGD jest zasadniczo przeznaczona dla laboratoriów wykonujących testy obciążeniowe i badania trwałości *Lm* w żywności RTE, w imieniu podmiotów prowadzących działalność gospodarczą w zakresie rybołówstwa.

TGD ma zastosowanie głównie do paczkowanej żywności ¹RTE przeznaczonej dla konsumentów i zakładów żywienia² zbiorowego, zgodnie z rozporządzeniem UE 1169/2011, dla której należy określić "termin przydatności do spożycia".

¹żywność paczkowana" oznacza każdą pojedynczą sztukę przeznaczoną do prezentacji w takiej postaci konsumentowi finalnemu i zakładom żywienia zbiorowego, składającą się ze środka spożywczego i opakowania, w które został on zapakowany przed oferowaniem na sprzedaż, niezależnie od tego, czy takie opakowanie obejmuje dany środek spożywczy całkowicie czy też jedynie częściowo, ale w każdym przypadku w taki sposób, że zawartość nie może być zmieniona bez otwarcia lub zmiany opakowania; "żywność opakowana" nie obejmuje żywności pakowanej w miejscu sprzedaży na życzenie konsumenta lub pakowanej do sprzedaży bezpośrednio.

²zakład żywienia zbiorowego" oznacza każdy zakład (w tym pojazd lub stoisko stałe bądź ruchome), taki jak restauracje, stołówki, szkoły, szpitale i przedsiębiorstwa cateringowe, w którym w ramach prowadzonej działalności gospodarczej przygotowuje się żywność gotową do spożycia przez konsumenta finalnego.

Testy obciążeniowe dla paczkowanej żywności RTE powinny być przeprowadzane z użyciem produktu w jego ostatecznym, zapakowanym formacie, z uwzględnieniem racjonalnie przewidywalnych warunków dystrybucji, przechowywania i użycia. Okres przydatności do spożycia ustala się dla produktu w takim opakowaniu, w jakim jest on sprzedawany.

W przypadku produktów nieopakowanych należy uwzględnić dodatkowe czynniki, takie jak higrometria, dotyczące przechowywania produktu w racjonalnie przewidywalnych warunkach przechowywania; konieczne jest zatem dostosowanie protokołu eksperymentalnego do tego rodzaju produktów.

W przypadku produktów, które są przeznaczone do wystawiania luzem (*np.* duże bloki sera, kawałki szynki lub tubki sałatek delikatesowych), badania należy przeprowadzać z wykorzystaniem typowych opakowań, które mają być dostarczone do firm cateringowych lub konsumentów (*np.* szynka może być owinięta folią opakowaniową, sałatki mogą być umieszczane w plastikowych doniczkach).

3 Odniesienia normatywne

Obowiązuje najnowsze wydanie powołanego dokumentu (wraz z wszelkimi poprawkami):

- EN ISO 20976-1, Wymagania i wytyczne dotyczące prowadzenia testów obciążeniowych żywności i produktów paszowych - Część 1: Testy obciążeniowe mające na celu zbadanie potencjału wzrostu, czasu opóźnienia i maksymalnej szybkości wzrostu;
- EN ISO 11290-1 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i *Listeria* spp: Metoda wykrywania;
- EN ISO 11290-2 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i *Listeria* spp;
- PN-EN ISO 6887-1 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - Przygotowanie próbek do badań, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesiętnych do badań mikrobiologicznych - Część 1: Ogólne zasady przygotowywania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesiętnych;
- ISO/NP Mikrobiologia 23961, łańcucha żywnościowego - Określanie i stosowanie wartości kardynalnych.

4 Definicje

4.1 Żywność gotowa do spożycia (RTE)

Żywność gotowa do spożycia to żywność przeznaczona przez producenta lub wytwórcę do bezpośredniego spożycia przez ludzi bez konieczności gotowania lub innego przetwarzania mającego na celu wyeliminowanie lub zmniejszenie do dopuszczalnego poziomu mikroorganizmów, o których mowa. (rozporządzenie (WE) nr 2073/2005).

Żywność gotowa do spożycia może być skażona, ale poziom i częstotliwość skażenia jest zmienna i na ogół niska. Żywność, w której *Lm* może przetrwać i/lub rozwijać się, jest potencjalną przyczyną listeriozy, jeśli nie są przestrzegane instrukcje dotyczące przechowywania (temperatura/czas) lub przygotowania opisane przez FBO na opakowaniu.

Żywność RTE związana z występowaniem listeriozy u ludzi należy głównie do kategorii „mięso i produkty mięsne”, „ryby i produkty rybne” oraz „produkty mleczne”. Ogniska choroby nadal występują na całym świecie i są związane z wieloma wcześniej niezgłoszonymi nośnikami żywności, w tym z żywnością pochodzenia roślinnego, taką jak świeże i minimalnie przetworzone owoce (kantalupa, jabłka karmelowe) oraz warzywa i kielki. Ogniska związane są również ze zmieniającymi się nawykami konsumentów, takimi jak używanie mrożonek przeznaczonych do gotowania, ale używanych po rozmrożeniu (mrożona kukurydza).

4.2 Okres przydatności do spożycia żywności RTE

Okres przydatności do spożycia żywności definiuje się jako okres, w którym produkt pozostaje bezpieczny i spełnia swoje specyfikacje jakościowe w racjonalnie przewidywalnych warunkach przechowywania, dystrybucji i stosowania.

Zgodnie z rozporządzeniem WE 2073/2005 ten okres przydatności do spożycia odpowiada okresowi poprzedzającemu:

- termin przydatności do spożycia", tj. ostatni dzień, w którym produkt spożywczy musi zostać wykorzystany. W tym przypadku okres przydatności do spożycia odnosi się do bezpieczeństwa żywności;
- lub
- data minimalnej trwałości" lub "data przydatności do spożycia", tj. data, do której żywność zachowuje swoje szczególne właściwości pod warunkiem jej właściwego przechowywania. Odnosi się to głównie do jakości żywności (wygląd, zapach, konsystencja, smak itp.).

Mikrobiologiczny okres trwałości żywności odpowiada okresowi, w którym żywność pozostaje w ramach wcześniej określonych ilościowych limitów mikrobiologicznych. Okres ten rozpoczyna się od momentu wyprodukowania i/lub zapakowania żywności. Mikrobiologiczny okres przydatności żywności do spożycia jest środkiem kontroli bezpieczeństwa żywności, który musi zostać zatwierdzony w drodze badań określonych w załączniku II do rozporządzenia (WE) nr 2073/2005.

5 Rola FBO i laboratorium

Obowiązkiem FBO jest przeprowadzenie takich badań dotyczących okresu przydatności do spożycia, aby ustalić zgodność z kryteriami mikrobiologicznymi w całym okresie przydatności produktu do spożycia (załącznik 10.2). Testy obciążeniowe mogą być przeprowadzane jako część badania przydatności do spożycia. FBO jest odpowiedzialna za ustalenie okresu przydatności do spożycia w określonych warunkach, które powinny uwzględniać racjonalnie przewidywalne warunki podczas transportu, przechowywania u producenta, w handlu detalicznym i na poziomie konsumenta. Rolą FBO jest ustanowienie systemu zarządzania bezpieczeństwem żywności, dostarczenie odpowiednich danych na temat właściwości produktu, procesu produkcji, warunków przechowywania, z uwzględnieniem nieodłącznej zmienności związanej z produktem, warunkami przetwarzania i przechowywania.

Zadaniem laboratorium jest zaprojektowanie i przeprowadzenie testu obciążeniowego lub badania trwałości w oparciu o informacje dostarczone przez FBO. Laboratorium powinno dysponować wymaganą wiedzą fachową lub mieć dostęp do odpowiedniej wiedzy z zakresu mikrobiologii żywności, nauk o żywności, przetwarzania żywności i statystyki. Wiedza statystyczna obejmuje zrozumienie teorii pobierania próbek, projektowania eksperymentów i statystycznej analizy danych mikrobiologicznych.

Analizy w teście obciążeniowym są przeprowadzane w ramach systemu zapewnienia jakości. Zaleca się korzystanie z laboratorium posiadającego akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025 w odniesieniu do metod analitycznych stosowanych w teście obciążenia oraz przynajmniej metod wykrywania i oznaczania liczby *Lm*.

W przypadku laboratoriów nieakredytowanych minimalnym oczekiwanym poziomem zapewnienia jakości jest udokumentowanie dobrych praktyk laboratoryjnych, przeprowadzanie własnych badań metrologicznej kontroli jakości oraz pomyślne uczestnictwo w badaniach biegłości.

Rolą laboratorium jest przedstawienie wyników badania obciążeniowego lub badania trwałości, w tym wniosków dotyczących zachowania się *Lm* w badanym produkcie, w sprawozdaniu (sprawozdanie z badania obciążeniowego lub sprawozdanie z badania trwałości), które może być wykorzystane przez FBO jako część badania trwałości.

Wreszcie, obowiązkiem FBO jest interpretacja wyników i wniosków zawartych w sprawozdaniu laboratoryjnym. Interpretacja ta powinna zostać zapisana w sprawozdaniu z badania przydatności do spożycia, które powinno również zawierać dodatkowe informacje (np. początkowy poziom zanieczyszczenia produktu bezpośrednio po wyprodukowaniu, informacje o właściwościach fizykochemicznych produktów, informacje o profilu czasowo-temperaturowym przechowywania, informacje o procesie produkcji itp.)

Obowiązkiem FBO jest udostępnienie na wniosek właściwych organów sprawozdania z badań dotyczących okresu przydatności do spożycia produktu, aby umożliwić jego ocenę.

6 Test obciążeniowy

Test obciążeniowy jest badaniem laboratoryjnym stosowanym do oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktu. Ocenia się, czy produkt jest w stanie wspierać wzrost *Lm*, czy też nie.

Na wzrost *Lm* w żywności może wpływać wiele czynników lub ich kombinacja. Czynniki te dzielą się na parametry wewnętrzne i zewnętrzne (załącznik 10.3). Do parametrów wewnętrznych (związanych z samą żywnością) należą: pH, aktywność wody (a_w), NaCl, zawartość wilgoci, mikroflora tła, zawartość składników odżywczych i struktura żywności, zawartość konserwantów. Czynniki zewnętrzne (związane ze środowiskiem przechowywania żywności) obejmują atmosferę gazową, wilgotność względną, opakowanie oraz czasowo-temperaturowe warunki przechowywania.

Niektóre z czynników wpływających na wzrost *Lm* mogą różnić się w obrębie partii (zmienność wewnątrz partii) lub między partiami (zmienność między partiami), a zmienność tę należy ocenić przed rozpoczęciem testu obciążenia.

6.1 Warunki wstępne przed rozpoczęciem testu na wyzwanie

Przed rozpoczęciem testu obciążeniowego, FBO powinien być w stanie dostarczyć do laboratorium istotne informacje związane z badanym produktem. Cel tego pierwszego kroku jest wieloraki i pozwala na następujące działania:

- Zidentyfikuj czynniki, które mają wpływ na wzrost *Lm* i nadaj priorytet pomiarom tych czynników;
- Oceniać źródła zmienności czynników charakteryzujących wyrób i proces produkcyjny;
- Wykazać, że produkty analizowane podczas testów obciążeniowych są reprezentatywne dla produkcji.

Istotne informacje o produkcie wymagane przez laboratorium są następujące:

- Opis produktu (nazwa handlowa produktu, waga,...), nowa formuła, nowy produkt lub produkt z historią produkcji;
- Warunki przetwarzania (przynajmniej te, które są istotne w procesie produkcji: na przykład obróbka termiczna, suszenie, wędzenie, dojrzewanie, krojenie w plastry, mielenie, zamrażanie, rozmrażanie, peklowanie w soli, pakowanie itd...);
- Skład produktu (oznaczony na produkcie);
- Właściwości produktu, w tym zmienność między partiami produktu i w ich obrębie. W przypadku niektórych kategorii żywności należy również zwrócić uwagę, czy wartości niektórych właściwości zmieniają się w okresie przydatności do spożycia (np. wartości pH w produktach fermentowanych, serach lub wartości a_w w suchej szynce, serach twardych);

- Stan opakowania produktu końcowego (w tym zdjęcie produktu);
- Warunki przechowywania w okresie przydatności do spożycia (z uwzględnieniem racjonalnie przewidywalnych warunków podczas transportu, przechowywania u producenta, w handlu detalicznym i na poziomie konsumenta);
- Okres przydatności do spożycia, zalecane (instrukcje na opakowaniu) i racjonalnie przewidywalne warunki stosowania produktu.

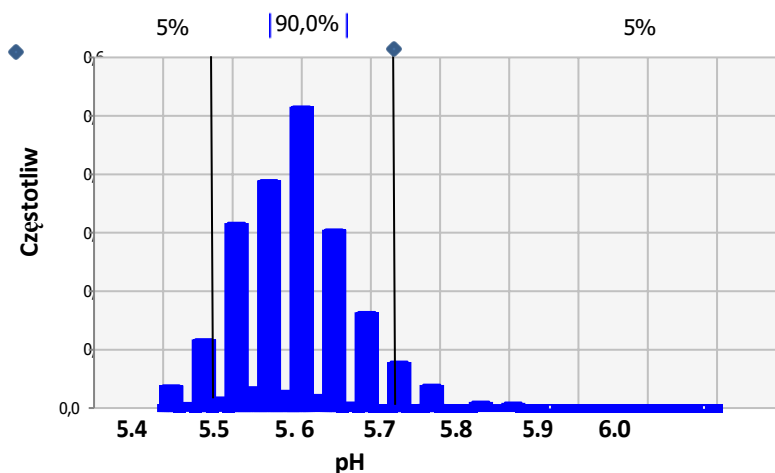
Schemat przepływu opisujący schematycznie różne etapy, od danych historycznych FBO do badania w laboratorium, znajduje się w załączniku 10.4.

Aby scharakteryzować produkt, zaleca się oszacowanie zmienności wewnątrz partii na podstawie co najmniej pięciu wartości, a zmienności między partiami na podstawie co najmniej trzech różnych partii analizowanych w okresie odzwierciedlającym możliwą zmienność. Ta minimalna liczba danych może być uznana za punkt wyjścia do scharakteryzowania zmienności czynników, które mają wpływ na wzrost *Lm*.

Poniżej podano przykłady, jak ocenić, zgodnie z dostępną ilością danych historycznych, czy właściwości badanych partii są reprezentatywne dla zmienności obserwowanej w normalnych warunkach przetwarzania.

- Przykład =1 Idealna sytuacja, w której FBO posiada liczne dane historyczne (produkt produkowany przez wiele lat)

Zbieranie danych zarejestrowanych przez FBO na poziomie produkcji na przestrzeni lat, daje dobrą informację na temat rozkładu pomiarów pH na komercjalizowanym produkcie (rys. 2).



Rysunek 2. Histogram wartości pH dla żywności RTE z danych historycznych

W oparciu o ten rozkład pomiarów pH kontrole żywności w badaniu obciążeniowym można uznać za reprezentatywne dla zmienności procesu produkcyjnego, jeżeli ich wartości pH mieszczą się w 90% zakresu danych historycznych.

- Przykład =2 Sytuacja, w której FBO ma ograniczone dane historyczne.

FBO scharakteryzowało trzy partie produktu spożywczego, dokonując tylko jednego pomiaru na partię (tabela 3).

Tabela 3. Tabela cech fizykochemicznych i mikrobiologicznych żywności RTE

| | PH | aw | Konserwant | Mikroflora ogółem |
|-----------------|-----|------|------------|-------------------|
| Partia 1 | 5.5 | 0.98 | 1.0% | 3.10 ⁴ |
| Partia 2 | 5.1 | 0.98 | 1.5% | 9.10 ⁴ |
| Partia 3 | 5.2 | 0.98 | 1.2% | 5.10 ⁴ |

W tym przypadku nie można ocenić, czy badane partie będą reprezentatywne dla procesu produkcji. Charakteryzowanie produktu przy tak ograniczonych danych nie jest wiarygodne. Powinno być co najmniej 5 wartości dla każdego czynnika na partię.

6.2 Test obciążeniowy oceniający potencjał wzrostu

6.2.1 Wstęp

Test obciążenia mikrobiologicznej oceniający potencjał wzrostu (Δ) jest badaniem laboratoryjnym, w którym mierzy się wzrost *Lm* w sztucznie zanieczyszczonej żywności przechowywanej w przewidywalnych warunkach na poziomie producenta, detalisty i konsumenta. Test obciążenia mikrobiologicznej musi odzwierciedlać przewidywalne warunki, jakich można się spodziewać w całym łańcuchu chłodniczym, w tym warunki przechowywania między produkcją a konsumpcją. Okres badania rozpoczyna się w dniu skażenia i kończy pod koniec okresu przydatności do spożycia.

Potencjał wzrostu (Δ) jest różnicą między najwyższym zaobserwowanym stężeniem *Lm* w log₁₀ cfu/g podczas badania a początkowym stężeniem *Lm* w log₁₀ cfu/g na początku badania.

$$\text{Potencjał wzrostu } (\Delta) = (\text{najwyższe obserwowane stężenie } Lm) - (\text{początkowe stężenie } Lm)$$

W ramach wdrażania rozporządzenia (WE) nr 2073/2005, Δ można stosować do:

- Klasyfikacji żywność:
 - gdy $\Delta > 0,5 \log_{10} \text{ cfu/g}$, żywność jest zaklasyfikowana do kategorii "Żywność gotowa do spożycia mogąca wspomagać wzrost *Lm*, inna niż przeznaczona dla niemowląt i do specjalnych celów medycznych" (kategoria 1.2),
 - gdy $\Delta \leq 0,5 \log_{10} \text{ cfu/g}$, żywność jest klasyfikowana jako "Gotowa do spożycia żywność, która nie może wspomagać wzrostu *Lm*, inna niż przeznaczona dla niemowląt i do specjalnych celów medycznych" (kategoria 1.3),
- Określić ilościowo wzrost *Lm* w żywności kategorii 1.2 zgodnie z określonymi, dającymi się racjonalnie przewidzieć warunkami w okresie między produkcją a konsumpcją.

W próbie obciążeniowej oceniającej potencjał wzrostu, do zawiesin komórkowych można zastosować stres lub adaptację w celu naśladowania stanu fizjologicznego bakterii, które najprawdopodobniej zanieczyszczą produkt.

Kilka przykładów, aby to zobrazować:

- Szczepy *Lm*, które mogą zanieczyścić pakowane gotowane mięso w plastrach, pochodzą z chłodnego środowiska produkcyjnego, a zatem szczepy powinny być przystosowane do wzrostu w warunkach chłodniczych;
- Inne przetworzone środki spożywcze, np. pasztety poddane obróbce wysokociśnieniowej (HPP), mogą nie być przeznaczone do osiągnięcia całkowitej inaktywacji obecnych w nich *Lm*, a zatem jeśli celem jest określenie okresu przydatności do spożycia po obróbce HPP, wówczas zastosowane szczepy *Lm* można poddać obróbce HPP w ramach przygotowania inokulum.

Wadą tego testu jest brak elastyczności w interpretacji: wyniki są ważne tylko dla produktu badanego w określonych warunkach, tak więc przy każdej zmianie (np. zastosowaniu różnych profili czasowo-temperaturowych, zmianie składników lub receptury) należy przeprowadzić nowe doświadczenia.

6.2.2 Protokół badania obciążeniowego w celu oceny potencjału wzrostu

6.2.2.1 Wybór partii

Z reguły w celu określenia mikrobiologicznego okresu przydatności do spożycia żywności RTE należy przebadać co najmniej kilka partii, aby móc uchwycić zmienność między partiami.³

Partie powinny być wysyłane do laboratorium jak najszybciej po wyprodukowaniu (tj. w dniu produkcji lub dzień później), aby uniknąć jakichkolwiek zmian w charakterystyce żywności między dniem produkcji a dniem zaszczepienia (patrz również pkt. 6.2.2.4).

Aby uwzględnić zmienność procesu produkcyjnego i produktu, zaleca się przeanalizowanie trzech partii pochodzących z różnych dni produkcyjnych. W praktyce oznacza to przeprowadzenie trzech różnych testów obciążeniowych.

Uwaga: W przypadku gdy różne partie są produkowane tego samego dnia, a zmienność między partiami obejmuje cały dzień (co należy uzasadnić), wówczas można zaakceptować wykonanie analiz partii³ wyprodukowanych tego samego dnia.

6.2.2.2 Wybór szczepów

Aby uwzględnić różnice we wzroście i przeżywalności między szczepami *Lm*, należy przeprowadzić test obciążenia z użyciem mieszaniny szczepów *Lm*. Do trzech partii należy użyć tych samych szczepów *Lm*.

Wzrost szczepów *Lm* różni się w zależności od badanej żywności i warunków przechowywania. Aby pomóc laboratoriom w znalezieniu i wyborze szczepów *Lm*, EURL *Lm* stworzyło zestaw szczepów *Lm* wyizolowanych z żywności różnego pochodzenia (mięso, ryby, produkty mleczne i środowisko). Szczepy te zostały scharakteryzowane pod kątem ich zdolności do wzrostu (μ_{max} zostały określone w trudnych warunkach pH, a_w i temperatury (załącznik 10.5). W załączniku tym podano również przykłady wyboru szczepu EURL *Lm*.

Zestaw szczepów EURL *Lm* jest dostępny dla krajowych laboratoriów referencyjnych, a następnie może być przez nie dostarczany na żądanie do laboratoriów w całym kraju.

Szczepy *Lm* powinny być przechowywane w laboratorium metodą, która minimalizuje lub eliminuje mutacje, które mogą mieć wpływ na ich charakterystykę wzrostu lub przetrwania. Wzrost, właściwości biochemiczne oraz typowanie molekularne powinny być regularnie sprawdzane przez laboratorium odpowiedzialne za wykonanie testu obciążenia.

6.2.2.3 Przygotowanie inokulum

Standaryzacja przygotowania inokulum jest szczególnie ważna, aby móc zaszczyć żywność RTE w oczekiwanym stężeniu 100 jtk/g lub ml (zakres od 50 do 200 jtk/g). (przykład obliczeń wyjaśniono w załączniku 10.6).

Aby być gotowym do inokulacji partii w dniu przybycia do laboratorium, subhodowle do przygotowania inokulum powinny być przeprowadzone z wyprzedzeniem. Całkowita objętość przygotowanej zawiesiny inokulum powinna być wystarczająco duża, aby można było zaszczyć wszystkie jednostki badane.

6.2.2.4 Inokulacja jednostek badanych

Inokulacja jednostek testowych jest krytycznym krokiem w przeprowadzaniu testu obciążenia. Powinno być ono wykonane tak szybko jak to możliwe po wyprodukowaniu partii, czyli w ciągu 2 dni. Jeżeli występuje opóźnienie w transporcie próbek do laboratorium lub jeżeli produkt ma długi okres przydatności do spożycia (np. ponad 6 tygodni), wówczas opóźnienie między dniem produkcji a rozpoczęciem testu obciążenia może być dłuższe niż 2 dni. W takim przypadku należy wykazać, że czas pomiędzy produkcją a inokulacją nie ma wpływu na strukturę, właściwości fizykochemiczne i florę mikrobiologiczną produktu.

W teście obciążenia proces inokulacji *Lm* powinien zapewnić jej jednorodne rozmieszczenie w żywności, nawet jeśli w rzeczywistości może to nie mieć miejsca. Dlatego należy obliczyć odchylenie standardowe liczby *Lm* uzyskane w dniu (0 dzień inokulacji) z trzech powtórzeń i powinno być ono niższe niż 0.3 log cfu/g. Jeżeli to odchylenie standardowe jest wyższe, wówczas test obciążeniowy dla badanej partii jest nie do przyjęcia i należy przeprowadzić nowy test obciążeniowy na innej partii.

Do sztucznego zanieczyszczania żywności RTE można stosować różne techniki inokulacji:

- Żywność jest wyjmowana z opakowania, zaszczepiana, a następnie przepakowywana w podobnych warunkach gazowych jak opakowanie nieotwarte (opakowanie konsumenckie). W tym przypadku laboratorium stosuje specjalne tacki i folie o podobnych właściwościach barierowych w porównaniu z oryginalnym opakowaniem. Żywność RTE może być zaszczepiona:
 - w głąb: dla żywności uważanej za jednorodną (np. żywność mielona) lub żywności przygotowanej przez zmieszanie kilku materiałów (np. mieszanka sałat),
 - na powierzchni: aby imitować zanieczyszczenie określonej części podczas procesu (np. produkty zanieczyszczone podczas krojenia).

W przypadku produktów składających się z wielu składników lub warstw należy zaszczepić jeden lub kilka składników istotnych z punktu widzenia zanieczyszczenia *Lm* lub interfejsów między składnikami (na przykład: sandwiche).

- Albo żywność jest utrzymywana w opakowaniu poprzez inokulację przez przegrodę, która jest natychmiast przykrywana drugą przegrodą w celu utrzymania dokładnych warunków gazowych.

Niektóre przykłady różnych technik zanieczyszczania są wyszczególnione w załączniku 10.7. Inne techniki mogą być stosowane, jeżeli można wykazać, że zawartość wilgoci nie ulegnie zmianie i nie wpłynie na wewnętrzne właściwości żywności (na przykład: zanurzenie).

Niezależnie od zastosowanej techniki skażenia, wskazane jest jej przetestowanie przed inokulacją *Lm*, poprzez użycie rozcieńczonego barwnika w celu uwidocznienia rozproszenia inokulowanej objętości.

W przypadku produktów odpakowywanych w zmodyfikowanej atmosferze należy zadbać o to, aby objętość przestrzeni chronionej i skład gazu w próbkach testowych jak najwierniej naśladowały komercyjny produkt spożywczy.

Poziom skażenia

Docelowy poziom zanieczyszczenia wynosi około cfu/g100 (zakres między 50-200 cfu/g).

Ten poziom zanieczyszczenia zmniejsza efekt niepewności pomiaru związany z niską liczbą. W szczególnych przypadkach, takich jak zaszczepianie produktów fermentowanych, można zastosować wyższy poziom zanieczyszczenia *Lm*, aby umożliwić łatwe wyliczenie i śledzenie wzrostu *Lm* wśród innych szczepów na agarze selektywnym.

6.2.2.5 Liczba jednostek - Liczba punktów poboru próbek

Patrz EN ISO 20976-1 dla części odnoszących się do:

- **Liczba jednostek, które mają być przygotowane** (liczba jednostek testowych, które mają być zaszczipione, liczba jednostek kontrolnych i próbek kontrolnych żywności);
- **Liczba punktów pobierania próbek.**

Patrz również załącznik do 10.8 niniejszego dokumentu.

6.2.2.6 Warunki przechowywania

Warunki przechowywania zastosowane podczas badania obciążeniowego (inkubacja jednostek badanych) muszą być zgodne z warunkami, w jakich produkt będzie najprawdopodobniej przechowywany podczas normalnego użytkowania do końca okresu przydatności do spożycia. Powinno to obejmować przewidywalny zakres temperatur wzdłuż łańcucha chłodniczego: od produkcji do sprzedaży detalicznej, przechowywania w sprzedaży detalicznej i przechowywania u konsumenta.

Temperatura podczas okresu przydatności do spożycia jest krytyczną częścią testu obciążenia oceniającego potencjał wzrostu (załącznik 10.9). FBO jest odpowiedzialna za zapewnienie, że zastosowane warunki przechowywania są realistyczne, biorąc pod uwagę, że temperatury przechowywania podane na opakowaniu nie zawsze mogą być utrzymane w całym łańcuchu chłodniczym (od produkcji do konsumpcji). Jeżeli podczas testu obciążenia stosowana jest nieodpowiednia temperatura przechowywania (niższa niż zazwyczaj), może dojść do niedoszacowania wzrostu Lm i przeszacowania bezpiecznej długości okresu przydatności do spożycia.

o Temperatura i czas przechowywania

Temperatura(-y) stosowana(-e) do określenia okresu trwałości produktu musi (muszą) być odpowiednio uzasadniona i udokumentowana przez FBO.

- W przypadku pierwszego etapu łańcucha chłodniczego (od produkcji do przybycia do gąbloty), gdy podmiot prowadzący działalność gospodarczą dysponuje własnymi danymi, preferowane jest wykorzystanie tych informacji. W tym przypadku należy wykorzystać 95 percentyl z obserwacji danych FBO. Jeśli dane nie są dostępne, należy użyć domyślnej temperatury z tabeli 4.
- W przypadku drugiego etapu (w handlu detalicznym: witryna) i trzeciego etapu (przechowywanie przez konsumenta) łańcucha chłodniczego, gdy informacje są dostępne, preferowane jest wykorzystanie danych krajowych, w których znajduje się dany etap łańcucha chłodniczego. W tym przypadku należy użyć 95 percentyla obserwacji danych. Jeśli dane nie są dostępne, należy zastosować domyślną temperaturę z tabeli 4.

Tabela 4. Schemat przepływu warunków przechowywania w całym łańcuchu chłodniczym

| Etap łańcucha chłodniczego | Temperatura przechowywania (inkubacji) | Czas przechowywania (inkubacji) | | |
|----------------------------|---|--|--|---|
| | | | Okres przydatności do spożycia (SL) ≤ 21 dni | Okres przydatności do spożycia (SL) >21 dni |
| Na poziomie producenta | Temperatura uzasadniona szczegółowymi informacjami* Lub jeśli nie jest znany 7°C | Czas trwania uzasadniony szczegółowymi informacjami Lub jeśli nie jest znany | 1/3 SL | 7 dni |
| Na poziomie detalicznym | Temperatura uzasadniona szczegółowymi informacjami** Lub jeśli nie jest znany 7°C | Czas trwania uzasadniony szczegółowym i informacjami Lub jeśli nie jest znany | 1/3 SL | 1/2 (SL-7) |
| Na poziomie konsumenta | Temperatura uzasadniona szczegółowymi informacjami** Lub jeśli nie jest znany 10°C | Czas trwania uzasadniony szczegółowym i informacjami Lub jeśli nie jest znany | 1/3 SL | 1/2 (SL-7) |

* Temperatura uzasadniona szczegółowymi informacjami: 95 percentyl obserwacji danych FBO

** Temperatura uzasadniona szczegółowymi informacjami: 95 percentyl z obserwacji dla kraju, w którym znajduje się dany etap łańcucha chłodniczego.

6.2.2.7 Pomiar parametrów fizykochemicznych

Należy znać fizykochemiczne właściwości produktu. Podstawą jest pH i a_w . Zamiast a_w można stosować również zawartość NaCl i [zawartość wilgoci lub suchej masy], w przypadku produktów, w których NaCl jest czynnikiem monitorującym aktywność wody. Na podstawie tych danych należy najpierw obliczyć zawartość soli w fazie wodnej WPS (w g/100ml):

$$WPS = \frac{\text{zawartość soli (w g na 100g)}}{\text{zawartość wilgoci (w ml na 100g)} \times \text{zawartość soli (w g na 100g)}} \times 100$$

a następnie oszacować a_w za pomocą następującego równania:

$$a_w = -1 \times W0.0052471PS - \times 0.00012206WPS^2$$

Wzór ten (Resnik, Chirife 1988) (Gimenez, Dalgaard, 2004) oparty jest na zawartości soli, ale inne składniki, takie jak zawartość cukru, mogą modyfikować wartości a_w , a w takim przypadku wzór ten nie może być stosowany.

Kalkulator dostępny w oprogramowaniu FSSP (Food Safety and Spoilage Predictor) (bezpłatny online: <http://fssp.food.dtu.dk/>), może być użyty do obliczenia zawartości fazy wodnej, znając % suchej masy, % NaCl w produkcie oraz do obliczenia aktywności wody (załącznik 10.10).

Ponadto mierzy się inne czynniki (np. kwasy organiczne), o ile są one istotne dla kontroli wzrostu *Lm* w produkcji (przykłady w załączniku 10.11).

Do pomiaru właściwości fizykochemicznych produktu preferuje się metody znormalizowane (np. ISO, EN lub krajowe). Pomiary te porównuje się z danymi pochodzącymi z normalnej produkcji żywności w celu wykazania, że partie użyte w teście obciążeniowym są reprezentatywne dla normalnego procesu produkcyjnego oraz że, najlepiej, partia użyta w teście obciążeniowym reprezentuje najgorszy scenariusz.

Podczas pomiaru właściwości fizykochemicznych produktu należy zbadać reprezentatywną część produktu, biorąc pod uwagę miejsca, w których spodziewana jest obecność *Lm* w produkcji. Poniżej przedstawiono kilka przykładów ilustrujących to zagadnienie:

- Mączki wieloskładnikowe (produkty kompozytowe):
Należy określić składnik w najgorszym przypadku i wykorzystać go do dalszych badań, gdy różne składniki są oddzielone w opakowaniu żywności i nie oddziałują na siebie. Jeżeli poszczególne składniki mają możliwość wzajemnego oddziaływania na siebie, na wzrost *Lm* będzie miało wpływ mikrośrodowisko, co należy wziąć pod uwagę.
- Ryby wędzone:
Lm jest prawdopodobnie obecny raczej na powierzchni produktu niż w jego wnętrzu. Z tego względu szczególne znaczenie mają właściwości chemiczne powierzchni produktu. Właściwości te mogą być inne niż we wnętrzu produktu.

Jeżeli pomiar tych parametrów fizykochemicznych jest zlecany na zewnątrz, wówczas należy przewidzieć co najmniej 2 dodatkowe jednostki kontrolne specjalnie dedykowane do tego celu.

○ Atmosfera gazowa

W przypadku przepakowanych jednostek testowych kondycjonowanych próżniowo, ważne jest, aby upewnić się co do wydajności maszyny próżniowej w celu uzyskania tych samych początkowych warunków próżniowych.

W przypadku przepakowanych jednostek testowych, początkowo kondycjonowanych w atmosferze modyfikowanej, ważne jest, aby stosować te same warunki pakowania w atmosferze modyfikowanej (MAP): skład gazu, stosunek gazu do produktu i przepuszczalność gazu materiału opakowaniowego (podobne właściwości barierowe).

W przypadku jednostek badań zapakowanych w zmodyfikowanej atmosferze i zaszczipionych przez przegrodę w oryginalnym opakowaniu, ważne jest sprawdzenie szczelności opakowania przez cały czas trwania testu obciążeniowego. Dlatego skład gazu powinien być mierzony za pomocą analizatora gazowego typu headspace, aby zapewnić, że w okresie przechowywania nie dojdzie do wycieku w opakowaniu.

Analizy te powinny być wykonane na próbce kontrolnej żywności na początku badania (t_0) i na końcu badania (t_{end}) na próbce kontrolnej żywności (bez przegrody) i na jednostce kontrolnej (z przegrodą), aby sprawdzić szczelność opakowania w całym okresie badania. (załącznik 10.12).

- Temperatura

Pomiar temperatur przechowywania jednostek badanych jest rejestrowany w czasie całego badania przy użyciu termicznego rejestratora danych w specjalnej kontrolnej jednostce badanej umieszczonej w tym samym inkubatorze i możliwie jak najbliżej pozostałych jednostek badanych.

6.2.2.8 Analizy mikrobiologiczne

Zawiesiny wstępne są przygotowywane, jeśli to możliwe, przy użyciu całej zanieczyszczonej jednostki badawczej, aby uwzględnić niejednorodność produktu (załącznik 10.13).

- Metody wykrywania i wyliczania *Lm*

Zgodnie z załącznikiem I do rozporządzenia nr 2073/2005 metodami referencyjnymi wykrywania i oznaczania liczby *L. monocytogenes* są odpowiednio EN ISO 11290-1 i EN ISO 11290-2. Ponieważ jednostki badań są sztucznie skażone *Lm*, nie jest konieczne przeprowadzanie etapu potwierdzenia podczas przeprowadzania oznaczania liczby bakterii.

Zgodnie z art. 5 tego samego rozporządzenia stosowanie alternatywnych metod analitycznych jest dopuszczalne, jeżeli metody te są zatwierdzone w odniesieniu do metody referencyjnej i jeżeli stosowana jest metoda własna, certyfikowana przez stronę trzecią zgodnie z protokołem określonym w normie EN/ISO 16140-2 lub innymi podobnymi protokołami uznanymi na szczeblu międzynarodowym. Inne metody są zatwierdzane zgodnie z protokołami przyjętymi na szczeblu międzynarodowym, a ich stosowanie jest zatwierdzane przez właściwy organ.

Z analiz wykrywalności *Lm* wynika, że w przypadku wykrycia *Lm* w kontroli żywności w danym momencie możliwe 0, jest dalsze wykonywanie testu obciążeniowego oceniającego potencjał wzrostowy na badanej partii (ze względu na inokulację wielu szczepów bakteryjnych), tylko wtedy, gdy poziom naturalnego zanieczyszczenia *Lm* jest niższy lub równy poziomowi inokulacji, który powinien mieścić się w zakresie [50-200 jtk/g].

W przypadku analiz oznaczania liczby *Lm*, ponieważ docelowy poziom zanieczyszczenia wynosi około jtk/g100 (zakres między 50-200 jtk/g), zaleca się:

- Obniżyć granicę wyliczania w cfu/g10, zgodnie z EN ISO 11290-2 o:
 - używając 1 ml zawiesiny wyjściowej rozprowadzić na 3 płytki 90 mm, lub rozprowadzić na 1 dużą płytkę 140 mm,
 - lub, w przypadku zatwierdzonych metod alternatywnych, wlać 1 ml na płytkę 1 o grubości mm.90
- Stosować metodę z niższym poziomem wykrywania dla policzenia niż EN ISO 11290-2, pod warunkiem że jest ona zatwierdzona i uznana za odpowiednią dla policzenia tak niskich poziomów z wystarczającą dokładnością.

Biorąc pod uwagę poziom inokulacji (docelowo pomiędzy 50 - 200 jtk/g), aby uniknąć sytuacji, w której podczas liczenia kolonii trzeba będzie zmierzyć się z niskimi liczbami (mniej niż kolonie 10 na płycie Petriego, zgodnie z EN ISO 7218), jest to możliwe:

- albo zmniejszyć współczynnik rozcieńczenia zawiesiny wyjściowej (np. 1/5th zamiast 1/10th),
- lub zwiększyć objętość zawiesiny nanoszonej na szalki (np. ml2 na płytkach 2 140 mm lub 2ml na 6 płytkach 90 mm).

Mikroflora tła, która może być brana pod uwagę, obejmuje mezofilne liczby tlenowe (EN ISO 4833) lub mikroflorę specyficzną dla danej żywności (np. bakterie kwasu mlekowego, *Pseudomonas* spp, drożdże, pleśnie). Metody stosowane do wyliczania tej specyficznej mikroflory powinny być zgodne z odpowiednimi normami EN ISO lub normami krajowymi dla danego organizmu i rodzaju żywności.

6.2.2.9 Obliczanie potencjału wzrostu

Dla każdej partii obliczany jest potencjał wzrostu Δ według wzoru:

$$\Delta = \log_{\max} - \log_i$$

gdzie \log_{\max} jest najwyższą wartością wyliczenia L_m otrzymaną z co najmniej 4 punktów pobierania próbek (z wyłączeniem pobierania próbek w t_0), gdy na jeden punkt pobierania próbek analizowana jest jedna jednostka badań.

Jeżeli w każdym punkcie pobierania próbek analizowana jest więcej niż jedna jednostka badana, wówczas \log_{\max} jest najwyższą wartością średnią uzyskaną z każdego z tych 4 punktów pobierania próbek.

\log_i jest średnią wartością 3 jednostek badanych analizowanych w czasie zerowym (t_0)

Zachowany potencjał wzrostowy wśród wszystkich badanych partii to najwyższa uzyskana wartość Δ .

W tym pierwszym przykładzie, przedstawiającym większość przypadków, analizowane są partie 3 (tabela 5). Dla każdej partii 5 punktów pobierania próbek jest rozłożonych w czasie trwania badania, a w każdym punkcie pobierania próbek analizowana jest 1 jednostka badana.

Tabela 5. Obliczanie potencjału wzrostu z partii - 3 punkty pobierania próbek - 1 jednostka badań na punkt pobierania próbek.

| | Czas 0 (t_0) | | Czas 1 | Czas 2 | Czas 3 | Czas 4 | Δ partia | Δ Żywność |
|----------|---------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|------------------|
| | [Lm] \log_{10} cfu/g | Średnia \pm sd* | [Lm] \log_{10} cfu/g | [Lm] \log_{10} cfu/g | [Lm] \log_{10} cfu/g | [Lm] \log_{10} cfu/g | | |
| partia 1 | 2.15 2.18 2.08 | 2.14 \pm 0.05 | 2.15 | 2.11 | 2.04 | 2.18 | 2.18 - 2.14 0.04 | 0.08 |
| partia 2 | 2.11 2.15 2.04 | 2.10 \pm 0.06 | 2.18 | 2.10 | 2.11 | 2.08 | 2.18 - 2.10 0.08 | |
| partia 3 | 2.16 2.26 2.18 | 2.20 \pm 0.05 | 2.20 | 2.14 | 2.24 | 2.06 | 2.24 - 2.20 0.04 | |

*sd: odchylenie standardowe

W tym pierwszym przykładzie odchylenie standardowe (sd) między wynikami³ w czasie (t₀) dla partii^{1, 2} i partii wynosi 3odpowiednio i0.05,0.06 log0.05₁₀. Etap inokulacji został przeprowadzony prawidłowo (<0,3 log₁₀), można zatem wykorzystać wyniki testu obciążenia uzyskane w celu oceny potencjału wzrostu.

W tym przykładzie najwyższą wartością "Δ" wśród partii³ jest log0.08₁₀.

Potencjał wzrostu jest poniżej kryterium 0,5 log₁₀, które określa, czy żywność RTE może czy nie może wspomagać wzrost *Lm*. Zatem ta żywność RTE nie sprzyja wzrostowi *Lm* i może być zaklasyfikowana do kategorii 1.3 rozporządzenia (WE) 2073/2005.

Uwaga: Jeżeli analizuje się 3 partie jednocześnie, wystarczy 1 punkt pobierania próbek w t₀ do obliczenia odchylenia standardowego.

Drugi przykład przedstawia wyniki testu obciążeniowego uzyskane z partii³, punktów pobierania próbek⁵ i 3 jednostek testowych na punkt pobierania próbek (ze względu na zmienność parametrów fizykochemicznych w badanym produkcie) (Tabela 6).

Tabela 6. Obliczanie potencjału wzrostu z partii³ - punkty pobierania próbek⁵ - 3 jednostki badań na punkt pobierania próbek.

| | Czas 0 (t ₀) | | Czas 1 | | Czas 2 | | Czas 3 | | Czas 4 | | Δ partia | Δ |
|----------|--------------------------|--------------------|----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|--------------------|-------------|
| | [Lm] | Średnia ± sd* | [Lm] | Średnia | [Lm] | Średnia | [Lm] | Średnia | [Lm] | Średnia | | |
| partia 1 | 2.10 2.28 1.80 | 2.06 ± 0.24 | 2.90 1.98 3.10 | 2.66 | 3.00 3.86 3.95 | 3.60 | 4.12 4.24 4.18 | 4.18 | 4.98 4.75 4.73 | 4.82 | 4.82 -2.06 2.68 | 3.30 |
| partia 2 | 1.48 2.36 2.18 | 2.00 ± 0.46 | | | | | | | | | | |
| partia 3 | 2.16 2.26 2.18 | 2.20 ± 0.05 | 1.80 3.00 3.10 | 2.63 | 3.90 3.95 3.97 | 3.94 | 4.20 4.31 4.50 | 4.34 | 5.80 5.30 5.40 | 5.50 | 5.50 -2.20 3.30 | |
| partia 4 | 2.20 2.04 1.96 | 2.06 ± 0.12 | 2.28 2.72 2.85 | 2.62 | 3.14 3.53 3.26 | 3.31 | 3.25 4.0 3.11 | 3.45 | 4.42 4.18 4.50 | 4.36 | 4.36 -2.06 2.30 | |

*sd: odchylenie standardowe

W tym czasie odchylenie 0,standardowe partii jest 2równe log10.0.46 Jest ono wyższe od tolerancji wynoszącej

0.3 log₁₀, co oznacza, że etap inokulacji nie został przeprowadzony prawidłowo. W związku z tym test obciążeniowy dla tej partii 2został przerwany, ponieważ rozpoczynanie testu obciążeniowego przy takiej różnicy między zaszczipionymi próbkami jest niedopuszczalne. Ponownie rozpoczęto test obciążeniowy z inną partią (nazwaną partią w4 tabeli).

Biorąc pod uwagę wyniki testu obciążeniowego przeprowadzonego na partii 1, partii 3 i partii 4 z tabeli 6 można ocenić potencjał wzrostowy *Lm* w badanym produkcie.

Najwyższą wartością "Δ" wśród partii³ jest log10.3.30 Potencjał wzrostu jest powyżej kryterium 0,5 log₁₀, który określa, czy żywność RTE jest w stanie wspierać wzrost *Lm*, czy nie. Zatem ta żywność RTE wspomaga wzrost *Lm* i jest zaklasyfikowana do kategorii 1.2 rozporządzenia (WE) 2073/2005.

6.2.2.10 Zastosowanie wyników

FBO jest odpowiedzialna za wykorzystanie wyników testu obciążeniowego. Wyniki testu obciążeniowego oceniającego potencjał wzrostu poinformują FBO o dwóch następujących kwestiach:

○ Zdolność produktu do wspierania wzrostu *Lm*

Pierwszą kwestią, którą należy rozstrzygnąć jest to, czy pokarm jest w stanie wspierać wzrost *Lm*, czy też nie:

- Δ jest niższe lub równe wartości granicznej $\log 0.5_{10}$, wówczas zakłada się, że żywność nie jest w stanie wspomagać wzrostu *Lm* (kategoria 1.3 rozporządzenia (WE) nr 2073/2005);
- Δ jest wyższe niż wartość graniczna $\log 0.5_{10}$, wówczas zakłada się, że żywność jest w stanie wspomagać wzrost *Lm* (kategoria 1.2 rozporządzenia (WE) nr 2073/2005).

○ Oszacowanie wzrostu *Lm* na podstawie uzyskanej wartości potencjału wzrostu

W przypadkach, w których zakłada się, że pokarm jest w stanie utrzymać wzrost *Lm*, wartość Δ może być użyta do oszacowania wzrostu (patrz przykłady poniżej):

najwyższe stężenie *Lm* podczas okresu przydatności do spożycia = początkowe stężenie *Lm* + Δ

W praktyce najwyższe stężenie *Lm* uzyskane z powyższych obliczeń może być wykorzystane do określenia, czy limit 100 jtk/g jest przekroczony, czy nie, przez cały okres przydatności do spożycia żywności.

○ Przykłady

PYTANIE 1: Czy pokarm wspiera wzrost *Lm*, zgodnie z wartością Δ ?

Na przykład potencjał 1, wzrostu wynosi:

$$\Delta = 0,08 \log_{10}$$

Δ wynosi poniżej $0,5 \log_{10}$, wówczas przyjmuje się, że żywność nie sprzyja wzrostowi *Lm*. Można ją zaklasyfikować do kategorii 1.3 rozporządzenia (WE) 2073/2005

W przykładzie potencjał 2, wzrostu wynosi: $\Delta = 3,30 \log_{10}$

Δ jest znacznie wyższe niż $0,5 \log_{10}$, wówczas przyjmuje się, że żywność wspomaga wzrost *Lm* i należy do kategorii 1.2 rozporządzenia (WE) 2073/2005.

Zatem, aby zapewnić, że zanieczyszczenie *Lm* nie przekroczy limitu $2 \log \text{cfu/g}$ na końcu okresu przydatności do spożycia, początkowe stężenie *Lm* (C_i) powinno być bardzo niskie, to znaczy poniżej $0,05 \text{cfu/g}$ ($C_i = 2,0 - 3,30 = -1,3 \log \text{cfu/g}$).

PYTANIE 2: Jakie jest najwyższe stężenie Lm w całym okresie przydatności żywności do spożycia, biorąc pod uwagę uzyskany potencjał wzrostu?

Przykład 1: Potencjał wzrostu wynosi:

$$\Delta = 0,7 \log_{10}$$

a początkowe stężenie Lm w produkcie wynosi $C_i = \log_{10} \text{cfu/g}$ (10 cfu/g)

Δ jest wyższa niż $0,5 \log_{10}$, wtedy zakłada się, że pokarm wspiera wzrost Lm . Ta wartość Δ może być wykorzystana do dalszych obliczeń. Najwyższe stężenie Lm w okresie przydatności żywności do spożycia może być oszacowane przy użyciu następującego równania:

$$\begin{aligned} \text{najwyższe stężenie } Lm &= \text{początkowe stężenie } Lm + \Delta \\ \text{najwyższe stężenie } Lm &= \log_{10} \text{jtk/g} + \log 0.70_{10} = \log 1.70_{10} \text{jtk/g} \\ &(\text{poniżej ustawowego limitu } 2 \log_{10} \text{jtk/g}) \end{aligned}$$

6.2.2.11 Sprawozdanie z badania

Wszystkie punkty, które należy uwzględnić w raporcie z badań, znajdują się w normie EN ISO 20976-1.

Ważne jest, aby w sprawozdaniu z badań zaznaczyć, że wyniki testów obciążeniowych dotyczących potencjału wzrostu odnoszą się wyłącznie do badanego produktu, w zastosowanych warunkach przechowywania (czas/temperatura). Każda zmiana receptury produktu, procesu produkcyjnego, warunków przechowywania (czas/temperatura) unieważniłaby wyniki badania trwałości i wymagałaby ponownego jego przeprowadzenia.

Jeżeli test obciążeniowy jest przeprowadzany dla pojedynczego produktu lub reprezentującego grupę produktów, należy to zaznaczyć w sprawozdaniu z badania.

Wykorzystanie wyników (jeżeli zostały podane przez właściwe laboratorium) nie wchodzi w zakres niniejszego sprawozdania z badania. Powinny one stanowić część raportu z badania przydatności do spożycia przygotowanego przez FBO.

6.3 Test obciążeniowy oceniający maksymalne tempo wzrostu

6.3.1 Wstęp

Badanie mikrobiologiczne oceniające maksymalne tempo wzrostu jest badaniem laboratoryjnym, w którym ocenia się wzrost *Lm* w żywności sztucznie zanieczyszczonej jednym szczepem *Lm* na raz i przechowywanej w stałej temperaturze (zwykle między 6° a 10°C) przez cały czas trwania badania.

Maksymalna szybkość wzrostu μ_{\max} jest parametrem kinetycznym, który charakteryzuje wzrost *Lm* populacja w fazie wykładniczej krzywej wzrostu na skali logarytmu naturalnego (Ln).

Z doświadczalnej krzywej wzrostu, otrzymanej przez wykreślenie stężenia *Lm* (wyrażonego w \log_{10} jtk/g) w stosunku do czasu (wyrażonego w godzinach lub dniach), odczytuje się maksymalną szybkość wzrostu V_{\max} .

Aby przejść z jednego do drugiego, zależność jest następująca: $\mu_{\max} = V_{\max} * \ln(10) = V_{\max} * 2.3$.

W literaturze naukowej oraz w większości narzędzi mikrobiologii predykcyjnej, maksymalna szybkość wzrostu jest zwykle podawana jako μ_{\max} , aby uniknąć pomyłek należy zwrócić uwagę na jednostki.

Czas trwania testu obciążeniowego oceniającego maksymalne tempo wzrostu może być różny od czasu trwania okresu przydatności produktu do spożycia. Czas jego trwania jest określony przez czas wymagany do skonstruowania krzywej wzrostu w wybranej temperaturze.

Zaletą testu obciążeniowego oceniającego maksymalne tempo wzrostu jest elastyczność: po określeniu w danych warunkach czasowych i temperaturowych, tempo wzrostu może być oszacowane w innych warunkach czasowych/temperaturowych bez potrzeby przeprowadzania kolejnego testu obciążeniowego, pod warunkiem, że znane są wartości kardynalne badanego szczepu.

Wadą tego testu jest brak uwzględnienia efektu fazy lag, co może prowadzić do różnych szacowanych stężeń *Lm* w zależności od tego, czy jest ona brana pod uwagę, czy nie. Najbardziej ekstremalnym przykładem jest prawdopodobnie żywność poddana działaniu HPP, gdzie wystąpi długa faza opóźnienia, ale wzrost wykładniczy będzie tak duży, jak w przypadku żywności niepoddanej obróbce termicznej.

6.3.2 Protokół testu obciążeniowego w celu oceny maksymalnego tempa wzrostu

Uwaga: W przypadku sekcji „Zaszczepianie jednostek testowych” i „Pomiar parametrów fizykochemicznych produktu”, należy odnieść się do części dotyczącej potencjału wzrostu, ponieważ są one identyczne. Poniższe sekcje są specyficzne dla protokołu oceny maksymalnego tempa wzrostu.

6.3.2.1 Liczba partii

Z reguły w celu określenia mikrobiologicznego okresu przydatności do spożycia żywności RTE należy przebadać co najmniej kilka partii, aby móc uchwycić zmienność między partiami.³

Jednakże, w oparciu o kalkulator "Inter-Batch Physico-Chemical Variability calculator" dostępny na stronie internetowej <http://standards.iso.org/iso/20976/-1/ed-1/en>, dostarczony wraz z normą EN- ISO 20976-1, test na wyzwanie może być przeprowadzony przy użyciu tylko jednej partii, jeśli:

- FBO może dostarczyć danych na temat czynników charakteryzujących produkt w obrębie partii (zmienność wewnątrz partii) i pomiędzy partiami (zmienność między partiami);
- parametry fizyko-chemiczne, pH i a_w , są głównymi czynnikami wpływającymi na wzrost L_m w produkcji;
- wpływ zmienności między partiami tych parametrów fizykochemicznych na wzrost L_m uznaje się za nieistotne (wynik działania kalkulatora).

Kalkulator ten może być wykorzystywany wyłącznie do testów obciążeniowych przeprowadzanych w celu oceny maksymalnego tempa wzrostu.

6.3.2.2 Wybór szczepów

Do każdego testu użyty jest jeden szczep, dlatego ważne jest, aby wybrać szczep o znanej charakterystyce wzrostu i odpowiedni dla rodzaju badanego produktu.

Szczep ten można wybrać z zestawu szczepów EURL L_m charakteryzujących się maksymalnym tempem wzrostu w niskiej temperaturze, pH i a_w . Można go zamówić w Krajowych Laboratoriach Referencyjnych L_m .

Zaleca się stosowanie szczepów charakteryzujących się wartościami kardynalnymi (zgodnie z normą ISO/NP 23961 "Określanie i stosowanie wartości kardynalnych", która nadal jest w trakcie opracowywania). Użycie takich szczepów pozwoli na dokładniejsze przewidywanie wzrostu szczepu w badanej żywności w różnych warunkach środowiskowych, niebadanych podczas testu obciążenia.

6.3.2.3 Przygotowanie inokulum

Warunki przygotowania inokulum są identyczne z opisanymi dla testu obciążenia oceniającego potencjał wzrostu, z tym wyjątkiem, że szczep jest hodowany i używany indywidualnie.

6.3.2.4 Inokulacja jednostek badanych

Warunki inokulacji jednostek badanych są identyczne do tych opisanych dla testu obciążenia oceniającego potencjał wzrostu, z wyjątkiem tego, że inokulacja jest wykonywana jednym szczepem, a nie mieszaniną szczepów dla każdej krzywej wzrostu.

6.3.2.5 *Liczba jednostek - Liczba punktów poboru próbek*

Patrz EN ISO 20976-1 dla części odnoszących się do:

- **Liczba jednostek, które mają być przygotowane** (liczba jednostek testowych, które mają być zaszczipione, liczba jednostek kontrolnych i próbek kontrolnych żywności);
- **Liczba punktów pobierania próbek.**

Patrz również załącznik do 10.14 niniejszego dokumentu.

6.3.2.6 *Warunki przechowywania*

Test obciążeniowy jest przeprowadzany w jednej stałej temperaturze. Temperatura przechowywania powinna wynosić od 6° do 10°C. W przypadku produktów zanieczyszczonych bakteriami kwasu mlekowego, temperatura nie powinna być wyższa niż 8°C, aby uniknąć zahamowania wzrostu bakterii kwasu mlekowego w wyższych temperaturach.

Czas trwania eksperymentu powinien być wystarczająco długi, aby zbudować krzywą wzrostu, a czas ten może być dłuższy lub krótszy niż badany okres przydatności do spożycia.

6.3.2.7 *Analizy mikrobiologiczne*

W przypadku wykrycia *Lm* w 6.2.2.8 badanej partii w próbce kontrolnej żywności, test obciążeniowy zostanie przerwany (ze względu na inokulację pojedynczego szczepu w teście obciążeniowym oceniającym maksymalne tempo wzrostu).

6.3.2.8 *Obliczanie maksymalnego wskaźnika wzrostu*

Dla każdej krzywej wzrostu (jedna krzywa wzrostu na partię), maksymalne tempo wzrostu może być łatwo oszacowane poprzez dopasowanie modelu pierwotnego (regresja nieliniowa) do wszystkich punktów doświadczalnych krzywej wzrostu. Dopasowanie to można wykonać za pomocą dostępnego bezpłatnie oprogramowania mikrobiologicznego o charakterze predykcyjnym, na przykład: DMFit z oprogramowania ComBase (www.combase.cc) lub Curve fitting z programu Sym'Previus (www.symprevius.eu).

Szacowana maksymalna szybkość wzrostu badanego produktu określona na podstawie testu obciążenia jest równa średniej (wyrażonej wraz z odchyleniem standardowym) wartości maksymalnej szybkości wzrostu uzyskanej z krzywych wzrostu (co najmniej jednej na partię).

Aby skonstruować krzywą wzrostu, należy zwrócić uwagę na rozkład punktów doświadczalnych w czasie, aby móc dokładnie oszacować maksymalne tempo wzrostu. Dla dobrego dopasowania modelu pierwotnego do punktów danych doświadczalnych ważne jest, aby jeden punkt znajdował się na początku fazy stacjonarnej, a drugi później w tej samej fazie (rysunek 3).

W zależności od oprogramowania użytego do oszacowania maksymalnego tempa wzrostu, wynik nie jest podawany w tej samej jednostce. W programie DMFit, jeżeli dane wejściowe są w $\log_{10}\text{cfu/g}$, to V_{\max} jest obliczane w $\log_{10}\text{cfu/g}$, czyli

konieczne jest pomnożenie go przez 2,3, aby otrzymać odpowiednią μ_{max} . W programie Sym'Previus dane wejściowe są podane w \log_{10} cfu/g, a maksymalna szybkość wzrostu (μ_{max}) jest podana i zawsze wyrażona w Ln cfu/g.

Należy pamiętać, że jeśli wzrost populacji drobnoustrojów obserwowany na podstawie krzywej wzrostu jest niewielki ($< 1 \log$ jtk/g), nie pozwala to na wiarygodne określenie μ_{max} . W takim przypadku można zalecić zbudowanie kolejnej krzywej wzrostu w wyższej temperaturze w celu dopasowania lub przeprowadzenie badania potencjału wzrostu.

Jeśli podejrzewa się, że produkt nie sprzyja wzrostowi *Lm* na podstawie właściwości fizykochemicznych, wówczas nie jest możliwe wiarygodne oszacowanie maksymalnego tempa wzrostu. Aby to udowodnić, należy przeprowadzić test oceniający potencjał wzrostu.

Wreszcie, ważne jest, aby ocenić niepewność wokół szacowanego maksymalnego tempa wzrostu (μ_{max}), odzwierciedloną przez błąd standardowy (se) lub przedział ufności (CI) wokół szacowanego μ_{max} . Ważne jest, aby błąd standardowy nie przekraczał 20% wartości szacunkowej μ_{max} . W przeciwnym razie oznacza to, że istnieje duża niepewność związana z μ_{max} , a wynik ten należy interpretować z ostrożnością.

6.3.2.9 Zastosowanie wyników

FBO jest odpowiedzialny za wykorzystanie wyników testu obciążeniowego.

Maksymalne tempo wzrostu może być wykorzystane do oceny wzrostu populacji *Lm* w okresie przydatności produktu do spożycia w różnych temperaturach przechowywania.

Na podstawie kinetyki wzrostu testu obciążeniowego, uzyskanej w jednej stałej temperaturze ($T^{\circ}CT$), można oszacować tempo wzrostu w innej temperaturze (T°).

Szybkość wzrostu określona przez dopasowanie modelu pierwotnego (np. DMFit) do kinetyki wzrostu jest oznaczana jako szybkość wzrostu CT. Następnie, przy użyciu modeli wtórnych można obliczyć tempo wzrostu w tym samym pokarmie (te same właściwości fizykochemiczne) w innej temperaturze T° .

Można zastosować następujące uproszczone równanie (Ratkowski et al., 1982) (Mejlholm et al., 2010) modelu wtórnego pierwiastka kwadratowego (jeden ze wszystkich dostępnych modeli wtórnych) (jeśli w symulacji uwzględnia się tylko temperaturę i jeśli T° i T_{CT} są niższe niż $25^{\circ}C$). Wzór ten nie uwzględnia wpływu bakterii kwasu mlekowego na hamowanie wzrostu *Lm*. Dlatego wzór ten nie jest odpowiedni dla produktów o wysokim poziomie bakterii kwasu mlekowego. W tym przypadku należy zastosować bardziej kompletny model.

$$\text{wskaźnik wzrostu } T^{\circ} = \frac{\text{wskaźnik wzrostu } CT \cdot (T - T_{min}^2)}{T_{CT} - T_{min}}$$

gdzie T_{min} jest minimalną temperaturą wzrostu dla *Lm* ($-2^{\circ}C$ jest wartością domyślną podaną w tabeli, która może być stosowana dla wszystkich szczepów jako wartość ogólna).

Wzrost *Lm* (w logach₁₀) dla czasu przechowywania d₁ (w dniach) w temperaturze T_{CT} = wskaźnik wzrostu CT (log₁₀cfu/g na dzień) x d₁ Wzrost *Lm* (w logach₁₀) dla czasu przechowywania d₂ (w dniach) w temperaturze T° = wskaźnik wzrostu T° (log₁₀cfu/g na dzień) x d₂ Uwaga: Dla tego obliczenia maksymalne tempo wzrostu musi być wyrażone w log10 (= Vmax).

Symulacja wzrostu może być stosowana do każdego profilu czasowo-temperaturowego, a w szczególności do warunków, w których produkt będzie najprawdopodobniej poddawany normalnej eksploatacji, aż do jego ostatecznego zużycia.

Model kardynalny jest kolejnym modelem wtórnym, który można zastosować. W tym przypadku, aby lepiej przewidzieć wzrost określonego szczepu *Lm* zaszczerpionego w produkcji, zaleca się określenie wartości kardynalnych (Tmin, T_{opt} i Tmax) tego szczepu w oparciu o normę ISO /NP 23691 "Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - określanie i stosowanie wartości kardynalnych" i wprowadzenie tych wartości do modelu kardynalnego. Do tego celu można wykorzystać przyjazne dla użytkownika narzędzia (np. Growth Simulation z programu Sym' Previus (www.symprevius.eu)).

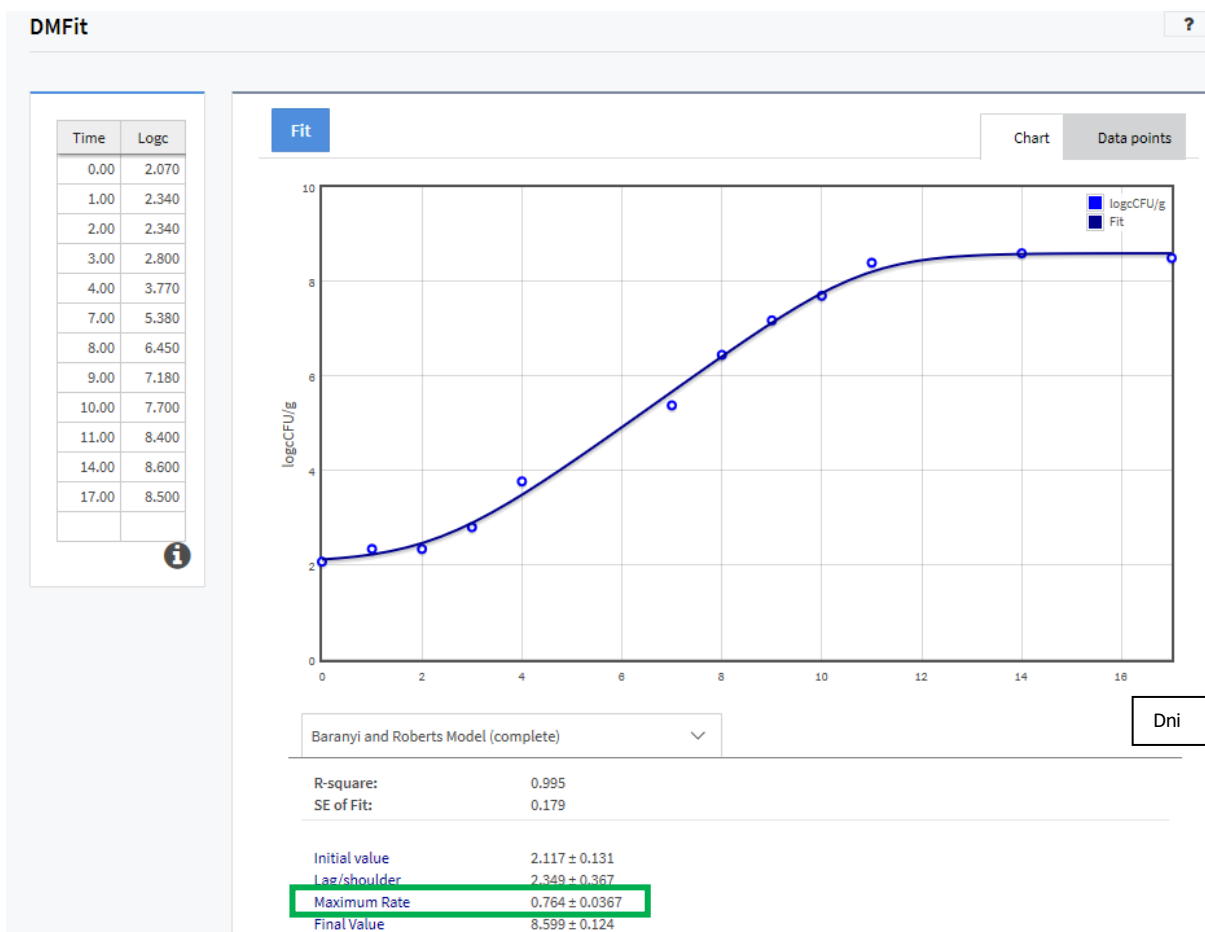
Przykład Oszacowanie l. przyrostu populacji *Lm* bez czasu opóźnienia

➤ **Dane:**

- Produkt o okresie przydatności do spożycia wynoszącym dni 9("dzień 0" to dzień produkcji);
- Warunki przechowywania: 4°C przez dni 3(d₁) i 8°C przez 6 dni (d₂);
- Test obciążeniowy został przeprowadzony na tym produkcie w temperaturze T_{CT} = 8°C.

Maksymalne tempo wzrostu (wraz z jego błędem standardowym) oszacowane w temperaturze 8°C na podstawie dopasowania wynosi: Wskaźnik wzrostu CT = 0,764 log₁₀ cfu/g . d⁻¹ ± 0,0367 (rys. 3).

Wizualny wygląd krzywej daje pewność, że punkty danych opisują całą krzywą sigmoidalną. Jeśli podzielimy błąd standardowy związany ze stopą wzrostu przez jej wartość, otrzymamy: 0.0367/0.764 = 4.8%. Jest to poniżej 20% progu niepewności i daje pewność, że oszacowanie tempa wzrostu jest dokładne.



Rysunek 3. Dopasowanie za pomocą DMFit z oprogramowania ComBase (www.combase.cc)

Zastosowanie uproszczonego równania pierwiastka kwadratowego modelu wtórnego pozwala na oszacowanie tempa wzrostu w temperaturze $T^\circ = 4^\circ\text{C}$

$$\text{tempo wzrostu } (T^\circ) = \text{tempo wzrostu}_{CT} \frac{(T^\circ - T_{\min})^2}{(T_{CT} - T_{\min})^2}$$

Maksymalne tempo wzrostu w temperaturze 4°C oszacowane na podstawie powyższego równania modelu wtórnego wynosi: Szybkość wzrostu $T^\circ (4^\circ\text{C}) = 0,764 \times (4 - (-2))^2 / (8 - (-2))^2 = 0,275 \log_{10} \text{cfu/g} \cdot \text{d}^{-1}$

➤ **Pytanie 1:** Jaki jest szacowany wzrost L_m w produkcie w okresie przydatności do spożycia?

Szacowany wzrost L_m w okresie przydatności do spożycia =.

(tempo₁ wzrostu (4°C) w $\log_{10}\text{cfu/g}$ na dzień) $\times d_1$ + (tempo₂ wzrostu (8°C) w $\log_{10} \text{cfu/g}$ na dzień) $\times d_2$ gdzie:

Szacowany wzrost L_m w okresie przydatności do spożycia = $(0,275 \times 3) + (0,764 \times 6) = \log 5.42_{10}$

To proste obliczenie nie uwzględnia fazy opóźnienia ani fazy stacjonarnej (tj. zakłada wzrost wykładniczy przez cały okres przydatności do spożycia) i w konsekwencji stanowi najgorszy scenariusz. Aby wypełnić tę lukę, można wykorzystać oprogramowanie do prognozowania mikrobiologicznego.

Przy uwzględnianiu czasu opóźnienia w szacowaniu okresu trwałości należy zachować ostrożność ze względu na trudności w ocenie stanu fizjologicznego *Lm* w momencie zanieczyszczenia produktu. Wybór uwzględnienia fazy opóźnienia powinien być uzasadniony/wyjaśniony.

Przykład Oszacowanie 2. przyrostu populacji *Lm*, gdzie uwzględniono czas opóźnienia.

➤ **Dane:**

- Produkt o okresie przydatności do spożycia wynoszącym dni 9 ("dzień 0" to dzień produkcji);
- Przechowywać w temperaturze 4°C przez 9 dni;
- Test obciążeniowy przeprowadzono na tym produkcie w temperaturze TCT = 8°C.

Na podstawie dopasowania uzyskanego w temperaturze 8°C, czas zalegania oszacowano na 2,35 dnia.

Zależność, opóźnienie x Wskaźnik wzrostu = h_0 (Baranyi i Roberts, 1994), jest wykorzystywana do obliczania stałej parametr h , na podstawie którego zostanie oszacowany czas opóźnienia w temperaturze 4°C.

Zgodnie z dopasowaniem w temperaturze 8°C, $h_0 = 0,76 \times 2,35 = 1,79$.

Zatem opóźnienie w temperaturze 4°C = $1,79/0,275 = 6,5$ dnia. Oznacza to, że wzrost rozpocznie się dopiero po 6,5 dniach w 4°C, co oznacza, że nie będzie wzrostu przez pierwsze 6,5 dnia w 4°C.

Następnie można ocenić wzrost w pozostałym okresie przechowywania $(9 - 6,5) = \text{dni } 2,5$ w 4°C.

Szacowany wzrost *Lm* podczas okresu przechowywania = $(0) + (0,275 \times 2,5) = 0,69 \log_{10}$

6.3.2.10 Sprawozdanie z badania

Wszystkie punkty, które należy uwzględnić w raporcie z badań, znajdują się w normie EN ISO 20976-1.

Wyniki testu obciążenia odnoszą się do badanego produktu (μ_{\max} jest specyficzne dla użytego szczepu oraz dla wewnętrznych i zewnętrznych specyficznych cech badanego produktu). Jednakże, test ten dostarcza również użytecznych danych do symulacji wpływu zmienności tych cech (pH, a_w , konserwanty, temperatura) badanych produktów.

Wykorzystanie wyników (jeśli są one podane przez laboratorium kompetentne w zakresie mikrobiologii prognostycznej) nie wchodzi w zakres niniejszego raportu z badania. Powinno to być częścią raportu z badania przydatności do spożycia przygotowanego przez FBO.

7 Badanie trwałości

7.1 Wstęp

Badanie trwałości w odniesieniu do *Lm* to badanie laboratoryjne przeprowadzone w celu określenia stężenia *Lm* pod koniec okresu przydatności do spożycia w naturalnie skażonym produkcie przechowywanym w racjonalnie przewidywalnych warunkach od produkcji do konsumpcji.

Celem badań trwałości jest oszacowanie odsetka żywności RTE przekraczającego limit ilościowy 100 cfu/g pod koniec okresu przydatności do spożycia po okresie przechowywania odzwierciedlającym przewidywalne warunki dystrybucji, przechowywania i użycia.

Ten rodzaj badań nie jest odpowiedni do zatwierdzania mikrobiologicznego okresu przydatności do spożycia żywności RTE w odniesieniu do *Lm*, ze względu na niską częstość występowania, niski poziom zanieczyszczenia i niejednorodne rozmieszczenie zanieczyszczeń *Lm* w produktach stałych. W większości przypadków wyniki będą uzyskiwane z próbek niezanieczyszczonych *Lm*, co uniemożliwia wnioskowanie na temat rozwoju *Lm* w produkcie. Połączenie badań trwałości z innymi badaniami, takimi jak testy obciążeniowe lub mikrobiologia prognostyczna, przyczynia się do zatwierdzenia okresu przydatności do spożycia żywności typu RTE związanej z *Lm*.

W kontekście *Lm*, badanie trwałości może być odpowiednie w dwóch następujących przypadkach:

- a/ dla żywności RTE zdolnej do wzrostu *Lm* i często zanieczyszczonej niskim poziomem *Lm*, w celu sprawdzenia okresu przydatności do spożycia.
- b/ dla żywności RTE, w przypadku gdy partia jest nieoczekiwanie (przypadkowo) zanieczyszczona *Lm*, w celu oceny wzrostu *Lm* w przypadku naturalnego zanieczyszczenia.

7.2 Protokół badania trwałości

Podczas przeprowadzania badania trwałości należy rozważyć następujące kroki:

- Opis badanej żywności RTE;
- Pobieranie próbek żywności;
- Przechowywanie próbek ;
- Analizy mikrobiologiczne ;
- Wyniki.

7.2.1 Opis badanej żywności RTE

Patrz akapit 6.1 "Warunki wstępne przed rozpoczęciem testu obciążenia", w którym opisano istotne informacje wymagane przez laboratorium.

7.2.2 Pobieranie próbek żywności

Można przeprowadzić dwie procedury pobierania próbek żywności: Pojedyncze losowe pobieranie próbek lub ukierunkowane pobieranie próbek.

- Pojedynczy losowy dobór próby (załącznik 10.15):

Ta metoda pobierania próbek ma zastosowanie w przypadku żywności RTE, która może sprzyjać rozwojowi *Lm* i często jest zanieczyszczona niskim poziomem *Lm*. Pobieranie próbek powinno być powtarzane dla różnych partii w czasie (ten sam produkt, ten sam proces produkcyjny) w celu uzyskania danych, które mogą być zebrane w celu uzyskania większej pewności co do uzyskanego wyniku.

- Ukierunkowane pobieranie próbek:

Ta metoda pobierania próbek ma zastosowanie do żywności RTE, w przypadku wykrycia nieoczekiwanego zanieczyszczenia (przypadkowego zanieczyszczenia) *Lm* w partii przed wprowadzeniem jej do obrotu. W takim przypadku zaleca się pobranie jak największej liczby próbek ze skażonej partii, możliwie najbliżej daty produkcji.

7.2.3 Przechowywanie próbek

Patrz część "Warunki przechowywania" w paragrafie 6.2.2.6 "Test obciążeniowy oceniający potencjał wzrostu".

7.2.4 Analizy mikrobiologiczne

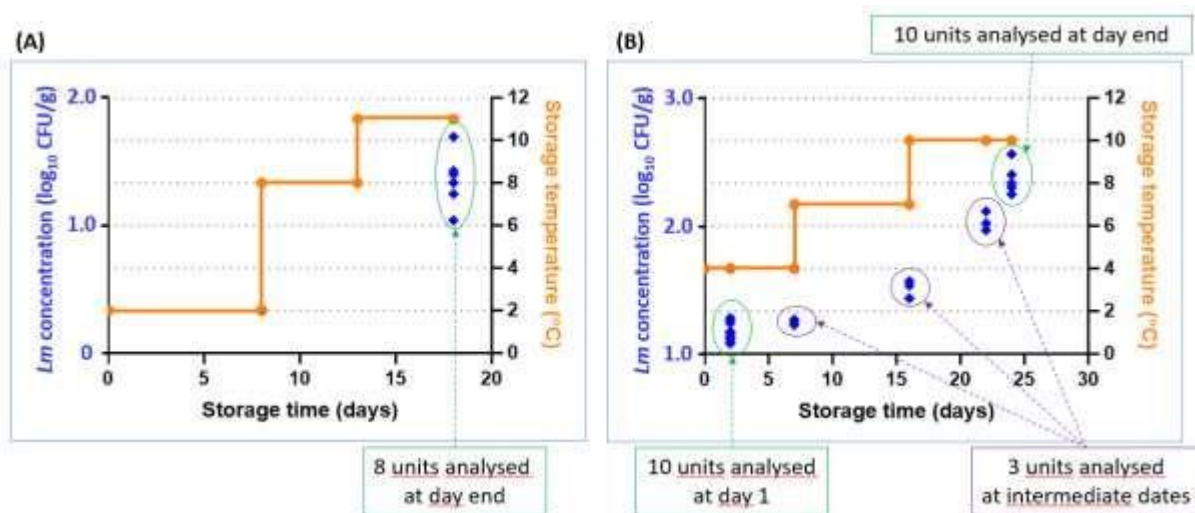
Zaleca się obniżenie limitu metody wyliczania do 10 jtk/g lub jeszcze niżej, aby mieć jak największą szansę na uzyskanie wyniku liczbowego (x jtk/g), a nieobciążonego przy < 100 jtk/g.

a/ Dla żywności RTE, która może sprzyjać wzrostowi *Lm* i jest często zanieczyszczona niskim poziomem *Lm*

Na koniec okresu przydatności do spożycia przeprowadza się analizy ilościowe wszystkich jednostek przechowywanych w racjonalnie przewidywalnych warunkach w celu oceny, czy poziom 100 *Lm*/g lub ml jest przekroczony, czy nie na końcu okresu przydatności do spożycia.

b/ W przypadku żywności RTE, gdy partia jest nieoczekiwanie (sztucznie) zanieczyszczona *Lm*

Analizy przeprowadza się co najmniej na początku (możliwie najbliżej daty produkcji) i na końcu okresu przydatności do spożycia. Jeżeli jest to możliwe, zaleca się wykonanie analiz w innych terminach pośrednich, dostarczających informacji o zachowaniu *Lm*.



Rysunek 4. Przykłady badań trwałościowych w przypadku wsadu często zanieczyszczonego niskim poziomem *Lm* (A) lub partia nieoczekiwanie zanieczyszczona *Lm* (B)

Na rysunku 4A wszystkie jednostki są analizowane na koniec dnia w celu uzyskania bardziej precyzyjnych informacji na temat proporcji jednostek, które mogą być powyżej 100 cfu/g na koniec okresu przechowywania. Na Rysunku 4- B, dziesięć próbek zostało przeanalizowanych w dniu, gdy 2, tylko partia została wykryta jako nieoczekiwanie skażona *Lm* o poziomie skażenia około 1 log₁₀ cfu/g (10 cfu/g). Następnie przy każdej zmianie temperatury przechowywania (odzwierciedlającej przewidywalne warunki przechowywania produktu) analizowano 3 próbki. Wzrost populacji *Lm* w tym naturalnie skażonym produkcie wynosi około 1,3 log₁₀ cfu/g. Ponadto w 10 próbkach oznaczono *Lm* w 24 dniu (koniec okresu przydatności do spożycia).

7.2.5 Wyniki

W przypadku żywności RTE zdolnej do podtrzymywania wzrostu *Lm* i często zanieczyszczonej niskim poziomem *Lm* interpretację tę można ułatwić, oceniając szacunkowy odsetek jednostek przekraczających 100 jtk/g pod koniec okresu przydatności do spożycia, po okresie przechowywania odzwierciedlającym przewidywalne warunki dystrybucji i przechowywania, jak opisano poniżej.

Z liczby (n) jednostek pobranych losowo z partii (o wielkości N) obserwowany odsetek (p) jednostek przekraczających 100 jtk/g na końcu okresu przydatności do spożycia wynosi:

$$p = r / n \text{ (gdzie } r \text{ jest liczbą jednostek testowych powyżej cfu/g100).}$$

Aby oszacować, z przedziałem ufności (CI) na poziomie 95%, odsetek jednostek powyżej cfu/g100 w całej populacji partii, można użyć następującego kalkulatora: http://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html.

Kalkulator udostępnia dwie metody obliczeń: centralny przedział ufności lub najkrótszy przedział ufności. Przedziały ufności (CI) podane każdą z metod mogą się nieznacznie różnić, ale są tego samego rzędu wielkości. Zaleca się stosowanie metody ogólnej, czyli centralnego przedziału ufności.

Tabela wskazuje na rzeczywiste znaczenie pobrania z jednej partii wystarczającej liczby jednostek i/lub zebrania wyników uzyskanych wcześniej, w celu uzyskania lepszego oszacowania proporcji jednostek powyżej 100 jtk/g.

Na przykład, gdy analizowane 10 są jednostki i że wśród tych jednostek żadna nie ma stężenia $Lm > 100 \text{ cfu/g}$, wówczas szacowany odsetek jednostek $> 100 \text{ cfu/g}$ w całej populacji może osiągnąć 28% (górna wartość CI). Ta szacunkowa proporcja wynosi 13% (górna wartość CI), gdy analizowanych jest 50 jednostek i 2 jednostki mają stężenie powyżej 100 jtk/g. Przykłady te podkreślają, że podawanie wartości górnego przedziału ufności ma znaczenie.

Tabela 7. Przykład szacunkowych proporcji jednostek $> 100 Lm/g$ w całej partii w odniesieniu do liczby analizowanych jednostek

| <i>n</i> liczba analizowanych jednostek | <i>r</i> liczba jednostek $> 100 \text{ jtk/g}$ | <i>p</i> obserwowana proporcja jednostek $> 100 \text{ cfu/g}$ | Szacowana proporcja (z CI na poziomie 95%) jednostek $> 100 \text{ jtk/g}$ w całej partii |
|--|--|---|---|
| 5 | 0 | 0% | [0% - 46%] |
| 10 | | 0% | [0% - 28%] |
| 20 | | 0% | [0% - 16%] |
| 30 | | 0% | [0% - 11%] |
| 50 | | 0% | [0% - 7%] |
| 100 | | 0% | [0% - 4%] |
| 5 | 1 | 20% | [4% - 64%] |
| 10 | | 10% | [2% - 41%] |
| 20 | | 5% | [1% - 24%] |
| 30 | | 3% | [0.7% - 16%] |
| 50 | | 2% | [0.4% - 10%] |
| 100 | | 1% | [0.2% - 5%] |
| 5 | 2 | 40% | [12% - 78%] |
| 10 | | 20% | [6% - 52%] |
| 20 | | 10% | [3% - 30%] |
| 30 | | 7% | [2% - 21%] |
| 50 | | 4% | [1% - 13%] |
| 100 | | 2% | [0.6% - 7%] |

Im więcej jednostek jest analizowanych, tym węższy jest przedział ufności. Aby uzyskać dużą liczbę analizowanych jednostek, można zebrać wyniki powtarzanych badań, przeprowadzonych na jednej żywności RTE, uzyskanej z tego samego produktu, tego samego procesu.

Uwaga: W przypadku badania partii (kontrola urzędowa), jednym z kryteriów określonych w rozporządzeniu nr 2073/2005 dla żywności RTE kategorii 1.2 (mogącej wspomagać wzrost *Lm*) jest "n=5, c=0, m=M=100 cfu/g" w momencie spożycia. W przypadku przekroczenia limitu określonego przez kryterium, produkt jest uznawany za niebezpieczny i nie może być wprowadzony na rynek. Wymagana jest zatem rewizja i udoskonalenie procesu produkcji, zmiana składu i/lub skrócenie okresu przydatności do spożycia. Takie kontrole zgodności partii nie są jednak objęte zakresem niniejszego dokumentu.

7.2.6 Sprawozdanie z badań

Raport z badania zawiera wszystkie informacje związane z pięcioma etapami badania trwałości:

- Badana żywność RTE (identyfikacja, skład, okres przydatności do spożycia, właściwości fizykochemiczne i mikrobiologiczne, proces produkcji, opakowanie, ...);
- Pobieranie próbek żywności (identyfikacja badanej partii, data pobierania próbek, zastosowana metoda, liczba badanych próbek);
- Warunki przechowywania (profil czasowy/temperaturowy, rejestracja temperatury przez cały czas trwania badania);
- Analizy mikrobiologiczne (metody analityczne, data(-y) analiz i liczba jednostek/data(-y));
- Wyniki uzyskane dla badanej partii (liczba analizowanych jednostek, liczba jednostek przekraczających jtk/g100, obserwowany i szacowany odsetek (z CI na poziomie 95%) jednostek przekraczających jtk/g100 w badanej partii).

8 Odniesienia

Afnor NF V45-008 Ryby przetworzone - Metoda filtracji dla niskiego poziomu wyliczenia (łosoś wędzony, pstrąg wędzony)

Arkusze danych Anses dotyczące zagrożeń biologicznych przenoszonych przez żywność "*Listeria monocytogenes*", kwiecień 2020 <https://www.anses.fr/en/system/files/BIORISK2016SA0081FiEN.pdf>

Augustin, J. C., V. Zuliani, *et al.* (2005). Tempo wzrostu i prawdopodobieństwo wzrostu *Listeria monocytogenes* w produktach mlecznych, mięsnych i owocach morza w warunkach suboptymalnych. *J Appl Microbiol* 99(5): 1019-42

Baranyi i Roberts (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23:277-294.

Codex Alimentarius. Ogólne wytyczne dotyczące pobierania próbek (CAC/GL 50-2004)

Komisja Codex Alimentarius. Wytyczne dotyczące zatwierdzania środków kontroli bezpieczeństwa żywności (CAC/GL 69-2008).

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych zmienione rozporządzeniem Komisji (UE) 2019/229

Dalgaard, P. i Jorgensen, L. V. (1998). Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 40 (1-2): 105-115.

DMFit firmy ComBase software. www.combase.cc

EFSA 2007b. Opinia panelu naukowego ds. zagrożeń biologicznych dotycząca kryteriów i celów mikrobiologicznych na podstawie analizy ryzyka. *EFSA Journal* 462: 1-29.
<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/462>

EURL *Lm* Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods, wersja 3 z 6 czerwca 2014 - poprawka 1 z lutego 2019.

Félix et al., (2018) Population Genetic Structure of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From the Pig and Pork Production Chain in France. *Front Microbiol* 6;9:684

Oprogramowanie do prognozowania bezpieczeństwa i psucia się żywności. <http://fssp.food.dtu.dk/>

Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności w Irlandii - Wytyczne nr 18. Walidacja okresu trwałości produktów (rewizja 4) https://www.fsai.ie/publications_GN18_shelf-life/

- Gillesberg Lassen et al., (2016) Two *Listeria* outbreaks caused by smoked fish consumption - using whole-genome sequencing for outbreak investigations. Clin Microbiol Infect. 22(7):620-4
- Giménez B., Dalgaard P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in cold smoked salmon. J Appl Microbiol 96(1):96-109
- Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready to eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs, EC/DG SANCO
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance_document_lysteria.pdf
- ISO 7218, Mikrobiologia żywności i pasz -- Ogólne wymagania i wytyczne dotyczące badań mikrobiologicznych
- ISO 11290-1 Mikrobiologia łańcucha pokarmowego - horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby
Listeria monocytogenes i *Listeria spp.* - Część 1: Metoda wykrywania
- ISO 11290-2 Mikrobiologia łańcucha pokarmowego - horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i *Listeria spp.* - Część 2: Metoda oznaczania liczby
- ISO 16140-2. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego - Walidacja metod - Część 2: Protokół walidacji metod alternatywnych (własnych) względem metody referencyjnej
- ISO Ogólne 17025 wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących
- Maury et al., (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. Nat Genet. 48(3):308-313
- McKellar, R.C. (2001). Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells. J Applied Microbiol, 90, 407- 413.
- Mejlholm et al., (2010) Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes*-An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. Int. J. Food Microbiol. 141 (2010) 137-150
- Ratkowski i in., (1982), Zależność między temperaturą a szybkością wzrostu kultur bakteryjnych. J Bacteriol. 149(1):1-5
- Rozporządzenie (UE) nr 1169/2011 w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności
- Resnik SL, Chirife J. (1988). Proposed Theoretical Water Activity Values at Various Temperatures for Selected Solutions to be Used as Reference Sources in the Range of Microbial Growth. [J Food Prot.](#) 51(5):419-423
- Oprogramowanie Sym'Previus : <https://symprevius.eu/software/>

9 Definicje

Łańcuch chłodniczy: ciągły system, który zapewnia przechowywanie w warunkach chłodniczych łatwo psującej się żywności, od produkcji do konsumpcji.

Jednostka kontrolna: jednostka żywności identyczna z jednostką badaną, ale nie sztucznie zanieczyszczona (stosowana jako ślepa próba)

Próbka kontrolna żywności: próbka kontrolna niepoddawana żadnemu przygotowaniu i stosowana w celu sprawdzenia reprezentatywności produkcji

Higrometria: pomiar wilgotności powietrza i gazów.

Percentyl: percentyl x^{th} zestawu wartości dzieli te wartości tak, że $x\%$ wartości leży poniżej i $(100-x)\%$ wartości leży powyżej. Przykłady: Dziewięćdziesiąt procent wartości leży na lub poniżej dziewięćdziesiątego percentyla, dziesięć procent powyżej niego. Mediana wartości odpowiada percentylowi 50^{th} , to znaczy pięćdziesiąt procent wartości leży poniżej mediany i pięćdziesiąt procent powyżej mediany.

pH: miara stężenia kwasowości lub zasadowości w roztworze wodnym. Wartość pH jest określana jako neutralna. Wartości pH mniejsze niż siedem są uważane za kwaśne, a większe niż siedem za zasadowe (alkaliczne).

Żywność gotowa do spożycia (RTE): żywność przeznaczona przez producenta lub wytwórcę do bezpośredniego spożycia przez ludzi bez konieczności gotowania lub innego przetwarzania mającego na celu wyeliminowanie lub zredukowanie do dopuszczalnego poziomu mikroorganizmów, o których mowa.

Okres przydatności do spożycia: okres czasu, w którym produkt pozostaje bezpieczny i spełnia swoje specyfikacje jakościowe w racjonalnie przewidywalnych warunkach przechowywania, dystrybucji i stosowania.

Walidacja: Uzyskanie dowodów na to, że środek kontroli lub kombinacja środków kontroli, jeśli zostały prawidłowo wdrożone, są w stanie kontrolować zagrożenie do określonego poziomu.

Weryfikacja: Zastosowanie metod, procedur, testów i innych ocen, oprócz monitorowania, w celu ustalenia, czy środek kontroli działa lub działał zgodnie z przeznaczeniem.

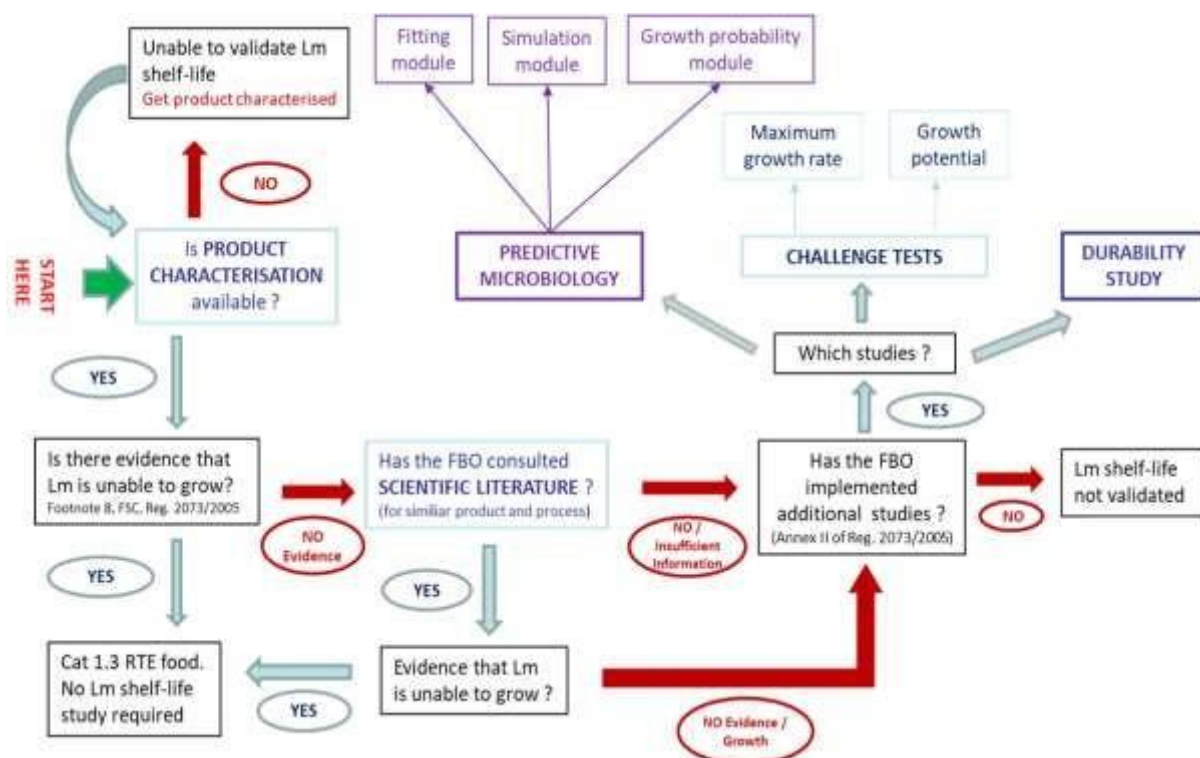
Sól w fazie wodnej (WPS): Procentowa zawartość soli w fazie wodnej produktu.

10 Załączniki

10.1 Tabela przedstawiająca korzyści/ograniczenia testów obciążeniowych oceniających potencjał wzrostu, maksymalne tempo wzrostu oraz badań trwałości.

| Rodzaj badania | Korzyści | Ograniczenia |
|---|---|---|
| Test obciążeniowy - Potencjał wzrostu (Δ) | <p>Dobre narzędzie do walidacji okresu trwałości</p> <p>Obliczanie Δ na podstawie prostego wzoru</p> <p>Wartość Δ pozwala określić, czy żywność RTE wspomaga czy nie wzrost <i>Lm</i>.</p> <p>Doświadczenia wymagają mniejszej liczby jednostek badań niż doświadczenia dotyczące maksymalnego tempa wzrostu</p> | <p>Wyniki ograniczone do warunków stosowanych w badaniu. Niemożliwa ekstrapolacja.</p> <p>Potrzeba informacji na temat profilu czasowego/temperaturowego w celu symulacji przewidywalnych warunków przechowywania żywności RTE</p> <p>Potrzebne inkubatory do precyzyjnego odtwarzania zdefiniowanego profilu temperatury</p> |
| Test obciążeniowy - Maksymalna szybkość wzrostu (μ_{max}) | <p>Dobre narzędzie do walidacji okresu trwałości</p> <p>Możliwość ekstrapolacji wyników na inne warunki</p> <p>Doświadczenie przeprowadzane w stałej temperaturze wybranej przez laboratorium</p> <p>Zyskany czas na ocenę długiego okresu przydatności do spożycia</p> <p>Zastosowanie μ_{max} w modelach mikrobiologii predykcyjnej pozwala oszacować poziom skażenia <i>Lm</i> w różnych warunkach środowiskowych</p> | <p>Konieczność posiadania wiedzy z zakresu mikrobiologii prognostycznej oraz stosowania oprogramowania do prognozowania mikrobiologicznego</p> <p>Potrzeba przeprowadzenia większej liczby eksperymentów w określonych odstępach czasu, stąd potrzeba większej liczby jednostek testowych.</p> <p>Szczepy są badane indywidualnie</p> <p>Jeżeli nie bierze się pod uwagę fazy opóźnienia, dlatego takie badanie może zawyżyć stężenie <i>Lm</i> w badanym produkcie</p> |
| Badanie trwałości | <p>Dobre narzędzie do weryfikacji ustalonego okresu przydatności do spożycia</p> <p>Łatwa do wdrożenia w laboratorium, nie wymaga specjalistycznego sprzętu</p> <p>Brak uprzedzeń dotyczących stanu fizjologicznego bakterii w żywności ze względu na naturalne zanieczyszczenie</p> <p>Możliwość zebrania badań dotyczących trwałości w celu zwiększenia poziomu zaufania do ustalonego okresu trwałości</p> | <p>Nie nadaje się samodzielnie do zatwierdzania mikrobiologicznego okresu przydatności do spożycia żywności typu RTE</p> <p>Niemożliwe jest zbadanie wszystkich możliwych do przewidzenia warunków przechowywania</p> <p>Niemożliwe jest ekstrapolowanie wyników na inne warunki</p> <p>Potrzeba informacji na temat profilu czasowego/temperaturowego w celu symulacji przewidywalnych warunków przechowywania żywności RTE</p> <p>Potrzeba uzyskania znaczącej liczby wyników, aby mieć większe zaufanie do interpretacji statystycznej</p> |

10.2 Schemat blokowy ustalania i weryfikacji okresu przydatności do spożycia żywności gotowej do spożycia w odniesieniu do *Listeria monocytogenes*



10.3 Wykaz parametrów charakteryzujących produkt, które mają wpływ na wzrost *Lm*

Intrinsic factors

- pH
- a_w (water activity)* or salt/sugar and moisture contents
- Organic acids, Nitrite
- Preservative content
- Background microflora
- Structure of the food

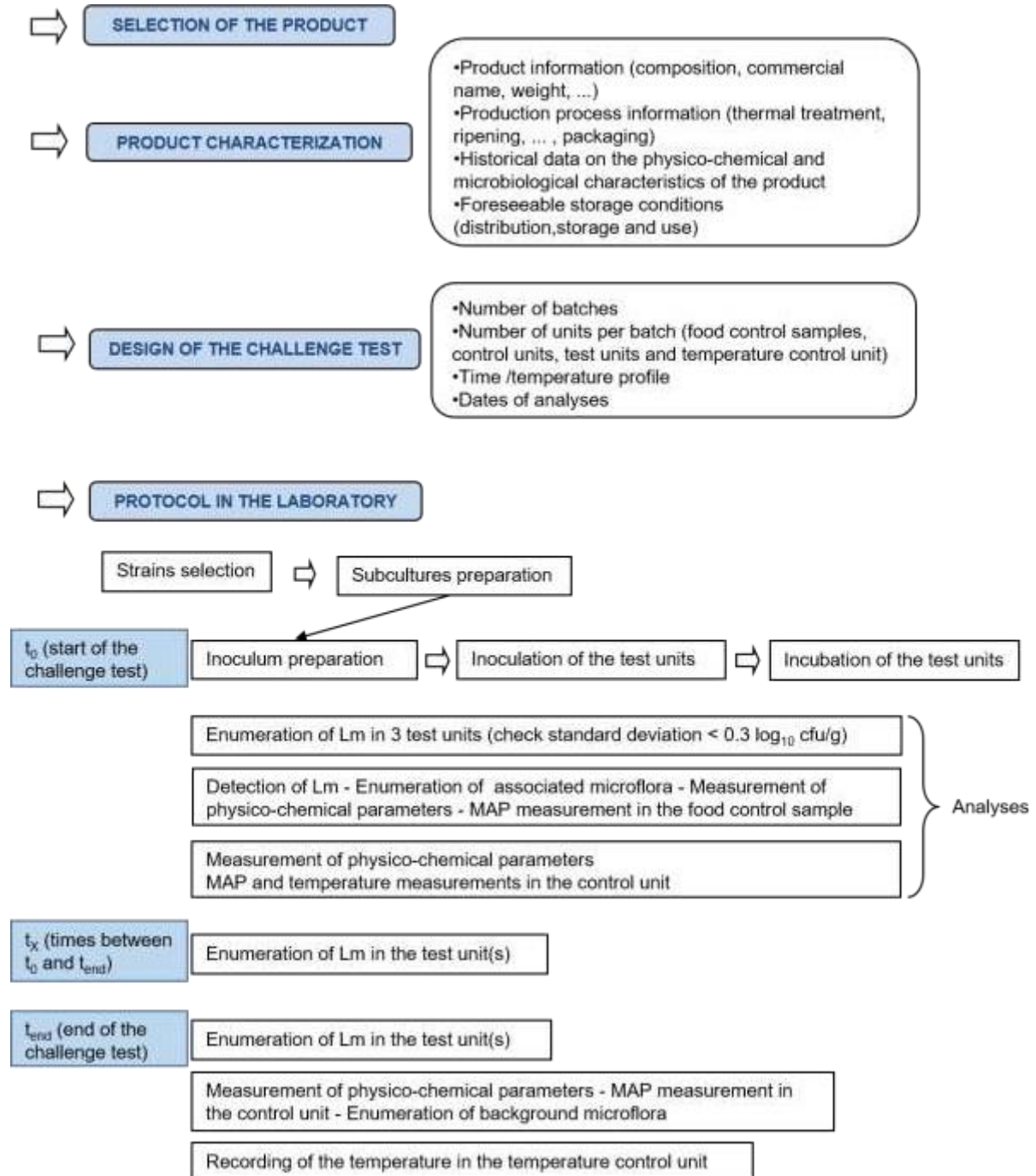
*) a_w (water activity) of a food

- defined as the ratio: vapor pressure of water in a food (p)/vapor pressure of pure water (p₀) at the same temperature
- represents the amount of free water in the food, available to support the growth of bacteria

Extrinsic factors

- Temperature of cold chain
 - From manufacturer
 - To intermediate storage, transport, retail and consumer
- Relative air humidity
(throughout storage for unpacked products)
- Packaging conditions of the end product
(air packed, vacuum, MAP, gas permeability of the packaging material)
- Gas composition
(for products under MAP)

10.4 Schemat przepływu opisujący schematycznie etapy od danych historycznych FBO do badania w laboratorium



10.5 Zestaw szczepów *L. monocytogenes* z ich charakterystyką wzrostu

Zestaw szczepów EURL *Lm* został sklasyfikowany na podstawie szybkości wzrostu w zależności od pochodzenia, warunków temperatury, pH i a_w oraz genoserotypów. Więcej szczegółów opisano w raporcie poświęconym szczepom zakwalifikowanym do testów obciążeniowych dostępnym na stronie <https://eurl-listeria.anses.fr/>.

Tabela Wybór8. szczepów w zależności od zdolności do wzrostu związanych z pochodzeniem, warunkami i genoserotypami

| Pochodzenie | Produkty mięsne | | |
|-------------|-------------------------------|--------------------------|---|
| Genoserotyp | Niskie a_w ($a_w = 0,95$) | Niskie pH (pH = 5) | Niska temperatura (T = 8°C) |
| II | 12MOB045LM 12MOB046LM | 12MOB045LM 12MOB046LM | 12MOB045LM 12MOB046LM |
| IV | 12MOB085LM 12MOB089LM | 12MOB112LM 12MOB089LM | 12MOB085LM 12MOB089LM |
| Pochodzenie | Produkty rybne | | |
| Genoserotyp | Niskie a_w ($a_w = 0,95$) | Niskie pH (pH = 5) | Niska temperatura (T = 8°C) |
| II | 12MOB101LM 12MOB100LM | 12MOB101LM 12MOB100LM | 12MOB099LM 12MOB101LM |
| IV | 12MOB103LM 12MOB102LM | 12MOB103LM 12MOB102LM | 12MOB102LM 12MOB107LM |
| Pochodzenie | Produkty mleczarskie | | |
| Genoserotyp | Niskie a_w ($a_w = 0,95$) | Niskie pH (pH = 5) | Niska temperatura (T = 8°C) |
| II | 12MOB098LM 12MOB118LM | 12MOB118LM 12MOB098LM | 12MOB098LM 12MOB079LM |
| IV | 12MOB096LM 12MOB106LM | 12MOB097LM 12MOB096LM | 12MOB096LM 12MOB105LM |
| Pochodzenie | Inne produkty | | |
| Genoserotyp | Niskie a_w ($a_w = 0,95$) | Niskie pH (pH = 5) | Niska temperatura (T = 8°C) |
| II | 12MOB048LM 12MOB047LM | 12MOB051LM 12MOB047LM | 12MOB049LM 12MOB047LM/ 12MOB051LM |
| IV | 12MOB050LM 12MOB052LM | 12MOB050LM 12MOB052LM | 12MOB052LM 12MOB050LM |

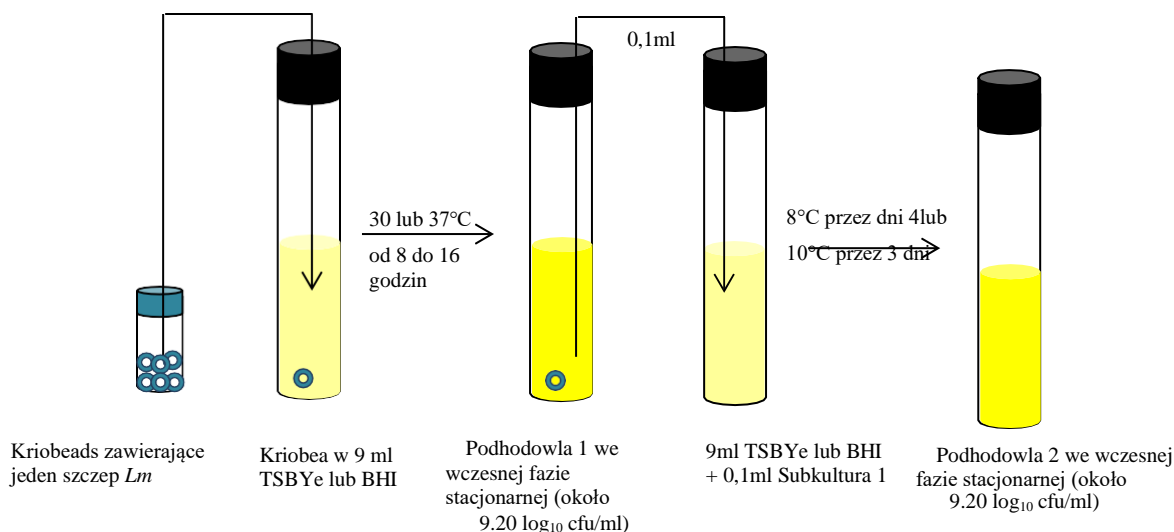
Jak korzystać z tej tabeli?

Przykład 1: jeśli badany produkt pochodzi z produktów mleczarskich, jest raczej kwaśny (pH ≤ 5), wówczas wybranym szczepem może być 12MOB118LM lub 12MOB098LM lub 12MOB097LM lub 12MOB096LM.

Przykład 2: jeśli badany produkt pochodzi z produktów mięsnych, nie jest kwaśny (pH > 5), ani nie ma niskiego a_w ($a_w > 0,95$), wówczas wybranym szczepem może być 12MOB045LM lub 12MOB046LM lub 12MOB085LM lub 12MOB089LM.

10.6 Przykład przygotowania inokulum do testu obciążeniowego

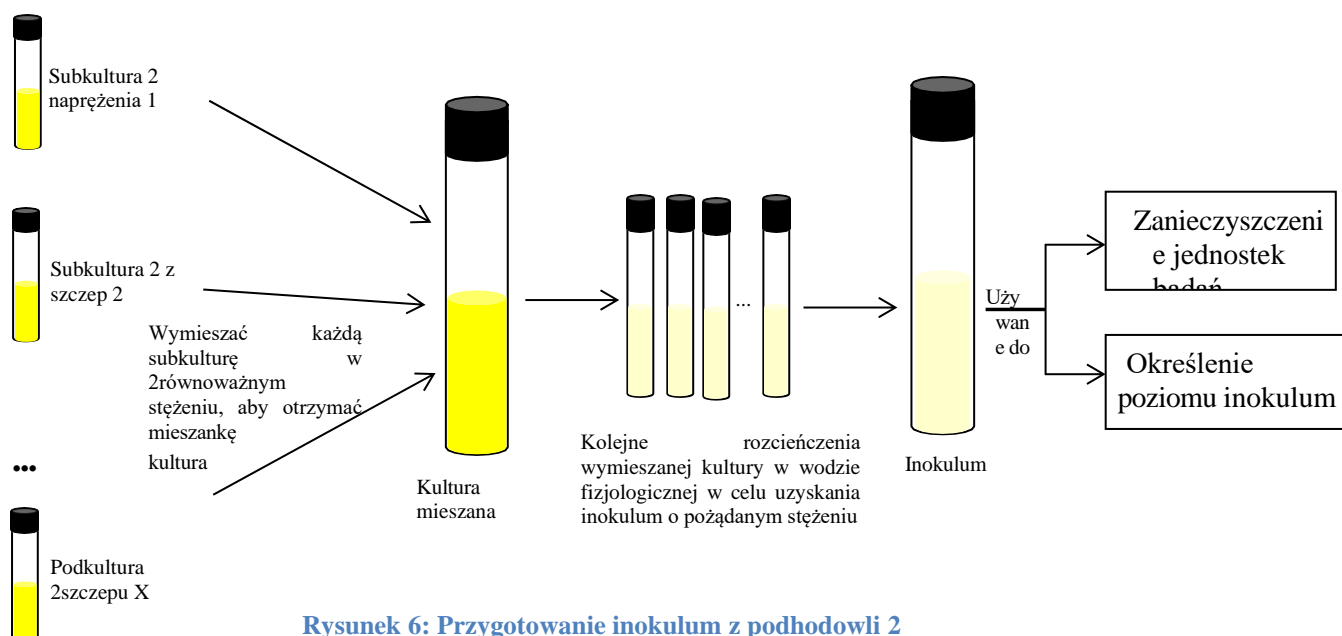
A. Przygotowanie podhodowli do szczepu 1



Rysunek 5: Przygotowanie podhodowli2 dla każdego szczepu

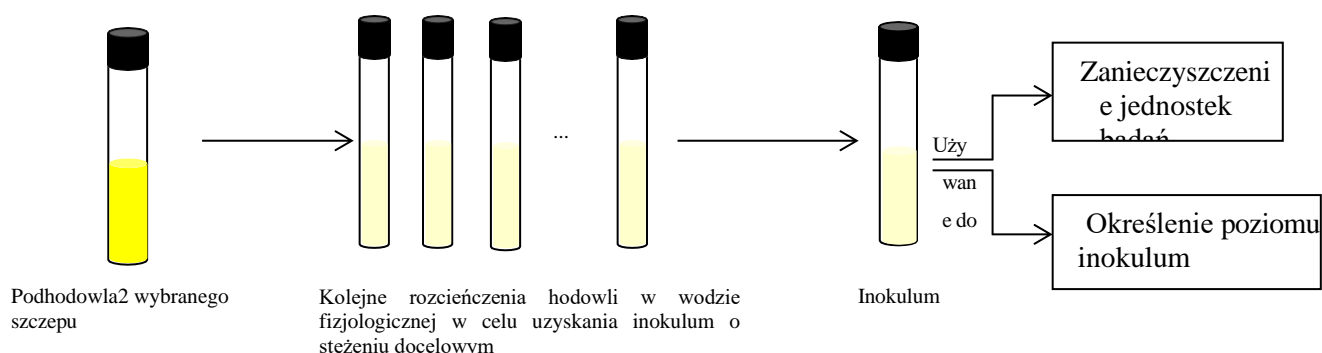
Proces powtarza się dla szczepu i innych szczepów, jeśli są używane. Podane wartości dotyczą szczepów EURL *Lm*.

B. Przygotowanie inokulum do testu obciążeniowego oceniającego potencjał wzrostu



Rysunek 6: Przygotowanie inokulum z podhodowli 2

C. Przygotowanie inokulum do testu obciążeniowego oceniającego maksymalne tempo wzrostu



Rys. 7: Przygotowanie inokulum z podhodowli 2jednego szczepu

D. Metoda uzyskiwania docelowego stężenia inokulum na przykładzie liczbowym

Hodowla mieszana do testu obciążenia oceniającego potencjał wzrostu ma szacunkowe stężenie $9,2 \log_{10}$ jtk/ml, czyli $1,58 \cdot 10^9$ jtk/ml.

Docelowe stężenie w całej matrycy wynosi cfu/g100.

Masa całej matrycy wynosi 650g. Objętość inokulum wprowadzanego do matrycy pokarmowej nie powinna przekraczać 1% masy całej matrycy; maksymalna objętość inokulum wynosi 6,5ml. W celu zbliżenia się do wymaganego stężenia inokulum w całej matrycy konieczne jest czterokrotne rozcieńczenie mieszanej kultury poprzez rozcieńczenia dziesiętne: $C_{\text{hodowla mieszana rozcieńczona}} = 1,58 \cdot 10^5$ jtk/ml.

Konieczne jest przygotowanie odpowiedniej ilości inokulum, aby można było zanieczyścić całą matrycę. Na przykład ml10, więc stężenie inokulum wynosi cfu/ml $1.58 \cdot 10^4$

Kolejnym krokiem jest określenie wymaganej objętości inokulum w celu skażenia 650 g matrycy.

Wiadomo, że:

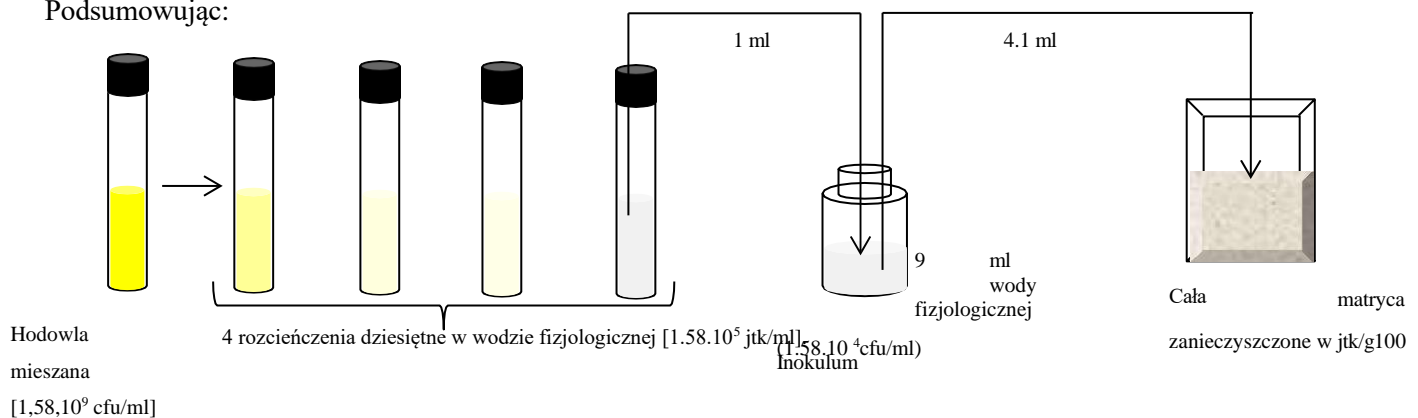
$$C_{\text{inokulum}} \times V_{\text{inokulum}} = C_{\text{whole matrix}} \times M_{\text{matrix}}$$

$$V_{\text{inokulum}} = (C_{\text{whole matrix}} \times M_{\text{matrix}}) / C_{\text{inokulum}}$$

$$V_{\text{inokulum}} = (100 \text{ cfu/g} \times 650 \text{ g}) / 1.58 \cdot 10^4$$

$$V_{\text{inokulum}} = 4,1 \text{ ml}$$

Podsumowując:



Rys. 8: Od hodowli mieszanej do inokulacji całej matrycy

Metoda uzyskiwania docelowego stężenia inokulum jest taka sama jak w przypadku testu obciążeniowego oceniającego maksymalne tempo wzrostu, z tą różnicą, że punktem wyjścia nie jest mieszana hodowla szczepów, lecz druga podhodowla jednego szczepu.

10.7 Kilka przykładów technik zanieczyszczania

Jednostki testowe mogą być zanieczyszczone w głębi lub na powierzchni.

W tym akapicie podano kilka przykładów kilku technik matrycowych i inokulacyjnych:

- W głębi: półpłynny produkt w małej ilości (20 g) w sterylnej torebce

na przykład g20 kremu skażonego przez pipetę



- Wgłębnie: półpłynny produkt w dużej ilości (≈ 500 g) w misce blendera, a następnie podzielony na x próbek po x g

na przykład krem w dużej ilości zanieczyszczony przez pipetę



- Na powierzchni: produkt w plastrach

na przykład plaster wędzonego łosia zanieczyszczony 5 plamkami po 20 μ l na połowie powierzchni krążka, a następnie krążek jest składany. W celu lepszego rozprowadzenia inokulum stosuje się rozsiewacz.



- Na powierzchni: produkt stały składający się z małych kawałków

na przykład rozdrobniona szynka zanieczyszczona na powierzchni kawałków za pomocą strzykawki z podziałką przez przegrodę. Ta przegroda jest natychmiast odzyskiwana przez drugą przegrodę, aby nie naruszyć atmosfery opakowania i utrzymać dokładne warunki gazowe.

Uwaga: Możliwe jest podzielenie inokulum na 2 części i wysłanie go przez 2 przegrody. Inokulum można podzielić na więcej części i przesłać przez więcej przegród. Po inokulacji, jednostki testowe należy mocno wstrząsnąć w celu jednorodnego rozprowadzenia inokulum.

PODWÓJNE
SEPTUM



10.8 Przykłady dotyczące całkowitej liczby jednostek wymaganych do przeprowadzenia testu sprawdzającego oceniającego potencjał wzrostu

Tabela 9. Przykład 1: Produkty pakowane powietrzem lub próżniowo -3 analizowane partie

| Rodzaj jednostek | Rodzaj analizy | Liczba jednostek i data analizy na partię | |
|----------------------------|---|---|--|
| Jednostki badań | Oznaczanie liczby <i>L. monocytogenes</i> | 7 | 3 jednostki badań w terminie t_0 i 1 jednostka badań w 3 terminach pośrednich i na 1 w t_{end} |
| Próbki kontrolne żywności | Wykrywanie <i>L. monocytogenes</i> | 1 | 1 w t_0 |
| | Pomiar właściwości fizykochemicznych | | |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | |
| Jednostki sterujące | Pomiar właściwości fizykochemicznych | 2 | 1 w t_0 i 1 na t_{end} |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | 1 | przez cały czas trwania testu |
| | Regulacja temperatury | | |
| Całkowita liczba jednostek | | 11 * | |

| | |
|---|------|
| Całkowita liczba wymagana dla partii ³ | 33 * |
|---|------|

(*) W zależności od ilości produktu w jednostkach, ta całkowita liczba może wymagać zwiększenia w celu uzyskania wystarczającej ilości produktu do przeprowadzenia wszystkich wymaganych analiz.

Tabela 10. Przykład 2: Produkty objęte programem MAP - 3partie poddane analizie

| Rodzaj jednostek | Rodzaj analizy | Liczba jednostek i data analizy na partię | |
|-------------------------------------|---|---|--|
| Jednostki badań | Oznaczanie liczby <i>L. monocytogenes</i> | 7 | 3 jednostki badań w t_0 i 1 jednostka pośrednie ³ oraz 1 na t_{end} |
| Próbki kontrolne żywności | Wykrywanie <i>L. monocytogenes</i> | 2 | 1 w t_0 |
| | Pomiar właściwości fizykochemicznych | | 1 w t_0 |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | 1 w t_0 |
| | Pomiar MAP | | 1 w t_0 i 1 na t_{end} |
| Jednostki sterujące | Pomiar właściwości fizykochemicznych | 2 | 1 w t_0 i 1 na t_{end} |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | |
| | Pomiar MAP | | |
| | Regulacja temperatury | 1 | przez cały czas trwania testu |
| Całkowita liczba wymagana na partię | | 12* | |

| | |
|---|-----|
| Całkowita liczba wymagana dla partii ³ | 36* |
|---|-----|

(*) W zależności od ilości produktu w jednostkach, ta całkowita liczba może wymagać zwiększenia w celu uzyskania wystarczającej ilości produktu do przeprowadzenia wszystkich wymaganych analiz.

Tabela 11. Przykład 3: Produkty pakowane pneumatycznie lub próżniowo - analizowane 3partie - Pomiary parametrów fizykochemicznych zlecane na zewnątrz

| Rodzaj jednostek | Rodzaj analizy | Liczba jednostek i data analizy dla partii | |
|-------------------------------------|---|--|---|
| Jednostki badań | Oznaczenie liczby <i>L. monocytogenes</i> | 7 | 3 jednostki badań w t_0 i jednostki pośrednie 3 oraz 1 na t_{end} |
| Próbki kontrolne żywności | Wykrywanie <i>L. monocytogenes</i> | 1 | 1 w t_0 |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | 1 w t_0 |
| | Pomiar właściwości fizykochemicznych | 2 (zlecone na zewnątrz) | 1 w t_0 i 1 w t_{end} |
| Jednostki sterujące | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | 2 | 1 w t_0 i 1 w t_{end} |
| | Pomiar właściwości fizykochemicznych | 2 (zlecone na zewnątrz) | |
| | Regulacja temperatury | 1 | przez cały czas trwania testu |
| Całkowita liczba wymagana na partię | | 15* | |

| | |
|--|-----|
| Całkowita liczba wymagana dla 3 partii 3 | 45* |
|--|-----|

(*) W zależności od ilości produktu w jednostkach, ta całkowita liczba może wymagać zwiększenia w celu uzyskania wystarczającej ilości produktu do przeprowadzenia wszystkich wymaganych analiz.

Tabela Przykład 12. 4: Produkty pakowane w atmosferze powietrza lub próżni - 3 analizowane partie - 3 jednostki badań analizowane w poszczególnych punktach pobierania próbek

| Rodzaj jednostek | Rodzaj analizy | Liczba jednostek i data analizy dla partii | |
|-------------------------------------|---|--|---|
| Jednostki badań | Oznaczenie liczby <i>L. monocytogenes</i> | 15 | 3 jednostki badań dla każdego z 5 punktów pobierania próbek |
| Próbki kontrolne żywności | Wykrywanie <i>L. monocytogenes</i> | 3 | 1 w t_0 |
| | Pomiar właściwości fizykochemicznych | | 3 w t_0 |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | 3 w t_0 |
| Jednostki sterujące | Pomiar właściwości fizykochemicznych | 3 | 3 w t_0 i t_{end} |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | |
| | Regulacja temperatury | 1 | przez cały czas trwania testu |
| Całkowita liczba wymagana na partię | | 22* | |

| | |
|--|-----|
| Całkowita liczba wymagana dla 3 partii | 66* |
|--|-----|

(*) W zależności od ilości produktu w jednostkach, ta całkowita liczba może wymagać zwiększenia w celu uzyskania wystarczającej ilości produktu do przeprowadzenia wszystkich wymaganych analiz.

10.9 Przykład wpływu temperatury przechowywania na okres przydatności do spożycia

Temperatura w okresie przydatności do spożycia jest krytycznym elementem testu oceniającego potencjał wzrostu. Poniżej przedstawiono to na przykładzie produktu mięsnego przechowywanego w różnych temperaturach:

- Scenariusz #1: w stałej temperaturze 4°C;
- Scenariusz #2: obejmuje 3 etapy (jedna trzecia okresu trwałości dla każdego etapu), (i) 4°C, aby naśladować przechowywanie/transport z zakładu do handlu detalicznego, (ii) 7°C, aby naśladować przechowywanie w handlu detalicznym oraz (iii) 10°C, aby naśladować przechowywanie u konsumenta;
- Scenariusz nr 3: obejmuje 3 etapy (jedna trzecia okresu przydatności do spożycia na każdym etapie), (i) 7°C w celu naśladowania przechowywania/transportu z zakładu do handlu detalicznego, (ii) 7°C w celu naśladowania przechowywania w handlu detalicznym oraz (iii) 10°C w celu naśladowania przechowywania u konsumenta.

Okres przydatności produktu do spożycia: dni.30

Fizykochemiczne właściwości produktu:

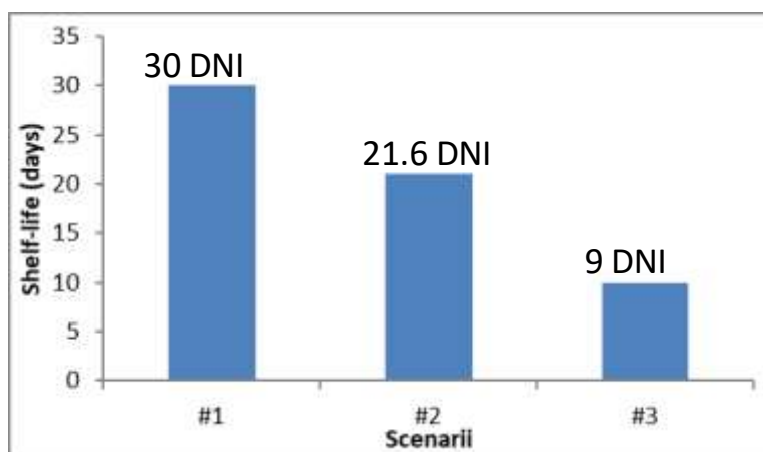
- pH = 6,1 i
- aw = 0.978.

Opakowanie produktu: 50% CO₂ / 50% N₂.

Zanieczyszczona porcja: 100g.

Średni początkowy poziom zanieczyszczenia *Listeria monocytogenes* w tym produkcie: -2 log₁₀ cfu/g.

Okres trwałości produktu jest szacowany dla każdego scenariusza (rys. 9).



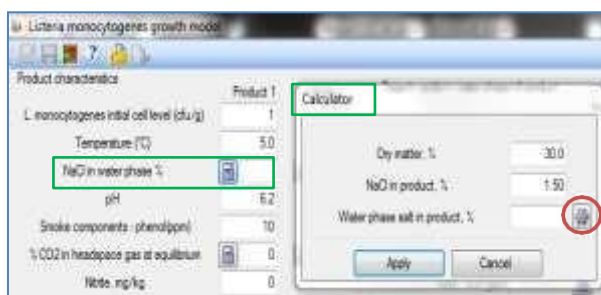
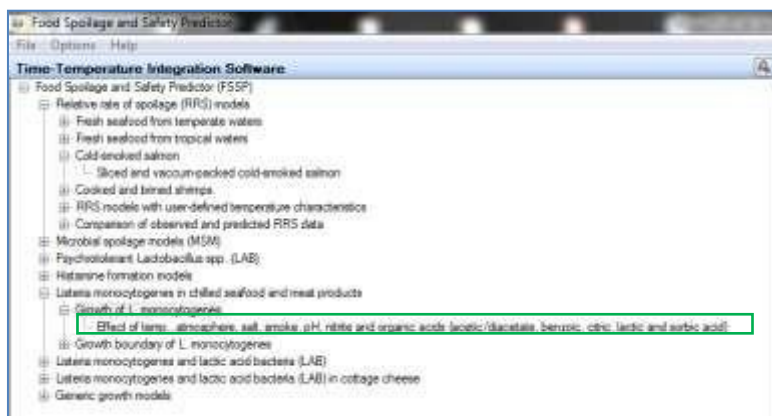
Rysunek 9: Okres przydatności do spożycia produktu mięsnego w zależności od różnych scenariuszy

Okres przydatności do spożycia produktu wynosi dni.30 w scenariuszu #1. Okresy trwałości uzyskane dla scenariusza #2 i #3 są odpowiednio 1,4 i 3 razy krótsze.

10.10 Wykorzystanie kalkulatora FSSP do obliczania WPS i obliczania _{aw}

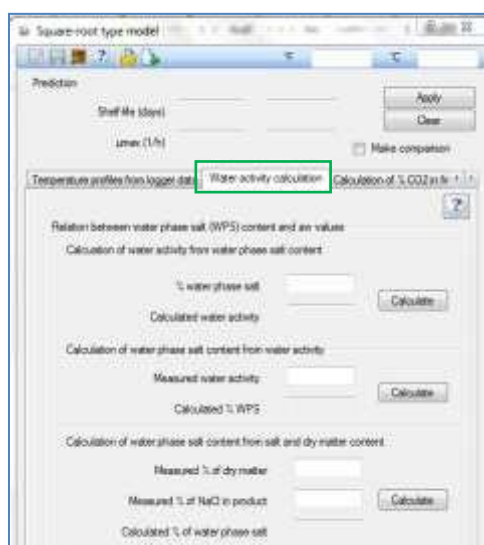
a - Obliczenia WPS

Z menu FSSP wybierz "*Listeria monocytogenes* w schłodzonych owocach morza i produktach mięsnych", następnie "Growth of *L. monocytogenes*" i "Effect of temp., atmosphere, salt, .".



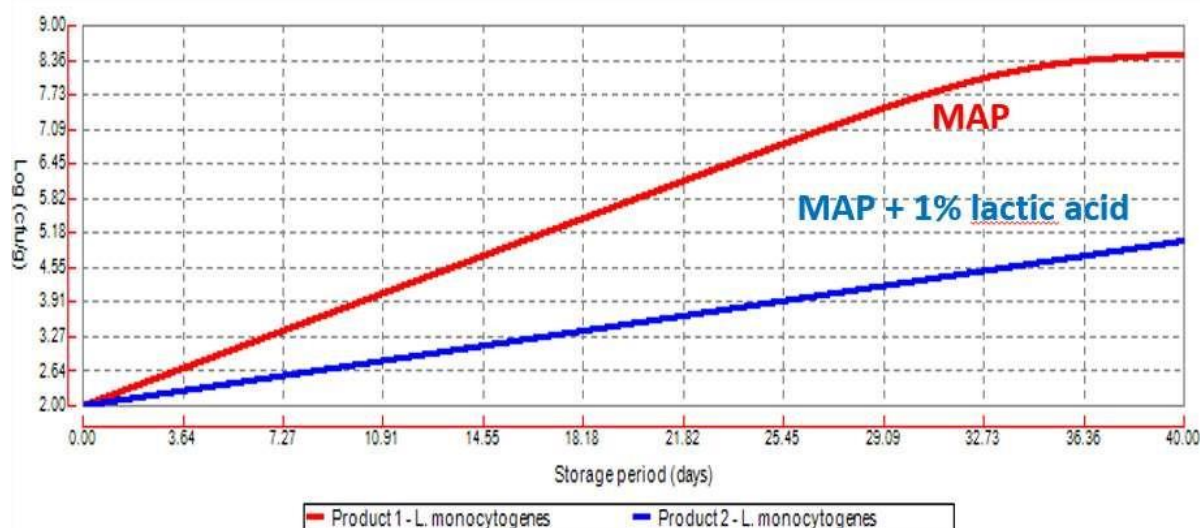
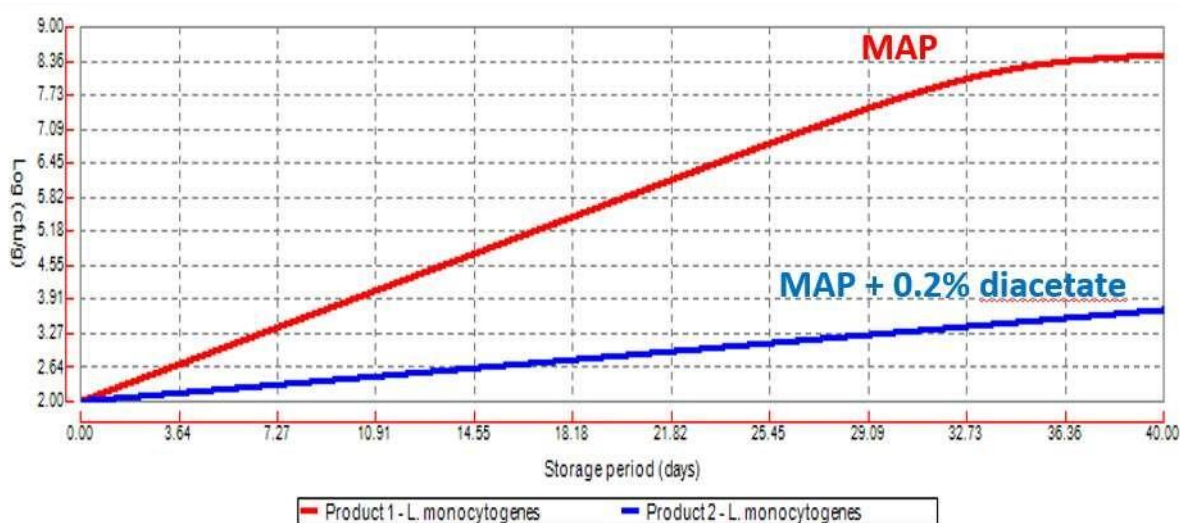
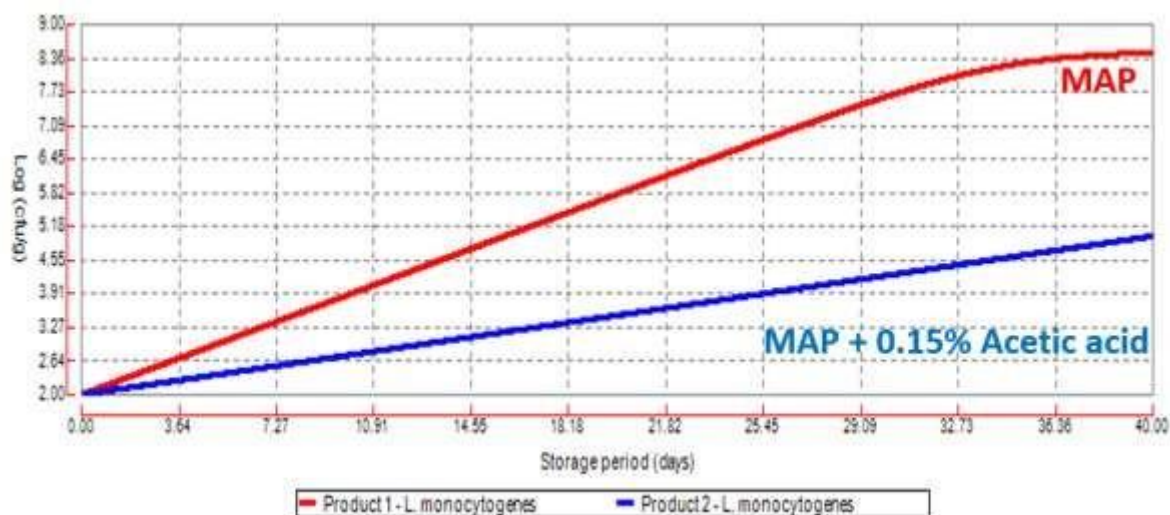
b - obliczanie _{aw}

Z menu FSSP wybierz "Modele psucia się drobnoustrojów (MSM)", następnie "Modele MS z wartościami parametrów zdefiniowanymi przez użytkownika" i "Model typu square-root".



10.11 Przykłady zastosowania kwasów organicznych jako konserwantów żywności

Symulacje wzrostu *Lm* przy użyciu programu Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP) na produktach spożywczych w warunkach MAP z dodatkiem lub bez kwasów organicznych.



10.12 Pomiar atmosfery gazowej w celu sprawdzenia szczelności opakowania

Przykład:

- Stężenie stosowanej mieszaniny gazów wynosi 70% N₂ i 30% CO₂,
- Stężenie mieszaniny gazów w opakowaniu próbek kontrolnych żywności w chwili t₀ i na końcu oraz w jednostce sterującej w chwili zakończenia testu obciążeniowego.

Tabela13. Przykład pomiaru mieszaniny gazów

| Kontrola | Czas przeprowadzania analiz | partia 1 | partia 2 | partia 3 |
|---|-----------------------------|---|--|--|
| Kontrolna próbka żywności (bez przegrody) | t ₀ | 0.8% O ₂ 7.9 %CO ₂ | 0.6%O ₂ 7,5% CO ₂ | 0.6%O ₂ 7,9% CO ₂ |
| Jednostka sterująca (z przegrodą) | t _{end} | 0% O ₂ 16.7 %CO ₂ | 0% O ₂ 22,6% CO ₂ | 0% O ₂ 13,8% CO ₂ |
| Próbka kontrolna żywności (bez przegrody) | t _{end} | 0% O ₂ 22,9% CO ₂ | 0% O ₂ 35,0% CO ₂ | 0% O ₂ 13.0 %CO ₂ |

W tendencji, porównanie stężenia O₂, na jednostce kontrolnej (z przegrodą) i na próbce kontrolnej żywności (bez przegrody), informuje o dobrej szczelności opakowania w okresie testowym (stężenie równe zero we wszystkich opakowaniach). Stężenie CO₂, w tych kontrolach (jednostka kontrolna i próbka kontrolna żywności) może być pomocne w interpretacji wzrostu *Lm*. W przypadku gdy CO₂ mogłoby być również monitorowane w jednostkach badanych, mogłoby to być użyteczne dane w identyfikacji obecności wartości odstających (w przypadku dużej różnicy we wzroście *Lm* między jednostkami).

10.13 Przykład przygotowania zawiesiny wyjściowej

Po sztucznym zaszczepieniu należy przeanalizować całkowitą ilość jednostki badanej.

W przypadku dużej ilości jednostki badanej zawiesinę początkową można przygotować przez:

- porcjowanie jednostek badań i analizowanie wszystkich porcji, lub;
- analiza całej porcji i przygotowanie zawiesiny wyjściowej w etapach2: wykonanie 2 kolejnych rozcieńczeń, np. pierwsze rozcieńczenie na połowę, a następnie drugie rozcieńczenie na 1/5.

Przykład: pierwsze rozcieńczenie wykonuje się przez pobranie 50 g matrycy z 50 ml rozcieńczalnika. Miesza się je, a następnie w drugim rozcieńczeniu g20 pierwszego rozcieńczenia rozcieńcza się o połowę ml80 rozcieńczalnika.

10.14 Przykłady dotyczące całkowitej liczby jednostek wymaganych do testu na wyzwanie oceniającego maksymalne tempo wzrostu

Tabela Przykład14. 1: Produkty pakowane powietrzem lub próżniowo -3 analizowane partie

| Rodzaj jednostek | Rodzaj analizy | Liczba jednostek i data analizy dla partii | |
|-------------------------------------|---|--|---|
| Jednostki badań | Oznaczanie liczby <i>L. monocytogenes</i> | 11 | 3 przy t_0 i 8 dla krzywej wzrostu w5 fazy wykładniczej |
| Próbki kontrolne żywności | Wykrywanie <i>L. monocytogenes</i> | 1 | 1 w t_0 |
| | Pomiar właściwości fizykochemicznych | | |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | |
| Jednostki sterujące | Pomiar właściwości fizykochemicznych | 2 | 1 w t_0 i 1 w t_{end} |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | |
| | Regulacja temperatury | 1 | Przez cały czas trwania testu |
| Całkowita liczba wymagana na partię | | 15* | |

| | |
|--|-----|
| Całkowita liczba wymagana dla 3 partii | 45* |
|--|-----|

(*) W zależności od ilości produktu w jednostkach, ta całkowita liczba może wymagać zwiększenia w celu uzyskania wystarczającej ilości produktu do przeprowadzenia wszystkich wymaganych analiz.

Tabela Przykład15. 2: Produkty objęte programem MAP - 3partie poddane analizie

| Rodzaj jednostek | Rodzaj analizy | Liczba jednostek i data analizy dla partii | |
|-------------------------------------|---|--|--|
| Jednostki badań | Oznaczanie liczby <i>L. monocytogenes</i> | 11 | 3 przy t_0 i 8 dla krzywej wzrostu z 5 w fazy wykładniczej |
| Próbki kontrolne żywności | Wykrywanie <i>L. monocytogenes</i> | 2 | 1 w t_0 1 w t_0 1 w t_0 1 w t_0 i 1 w t_{end} |
| | Pomiar właściwości fizykochemicznych | | |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | |
| | Pomiar MAP | | |
| Jednostki sterujące | Pomiar właściwości fizykochemicznych | 2 | 1 w t_0 i w 1 _{tendencji} |
| | Oznaczenie liczebności mikroflory towarzyszącej | | |
| | Pomiar MAP | | |
| | Regulacja temperatury | 1 | przez cały czas trwania testu |
| Całkowita liczba wymagana na partię | | 16* | |

| | |
|--|-----|
| Całkowita liczba wymagana dla 3 partii | 48* |
|--|-----|

(*) W zależności od ilości produktu w jednostkach, ta całkowita liczba może wymagać zwiększenia w celu uzyskania wystarczającej ilości produktu do przeprowadzenia wszystkich wymaganych analiz.

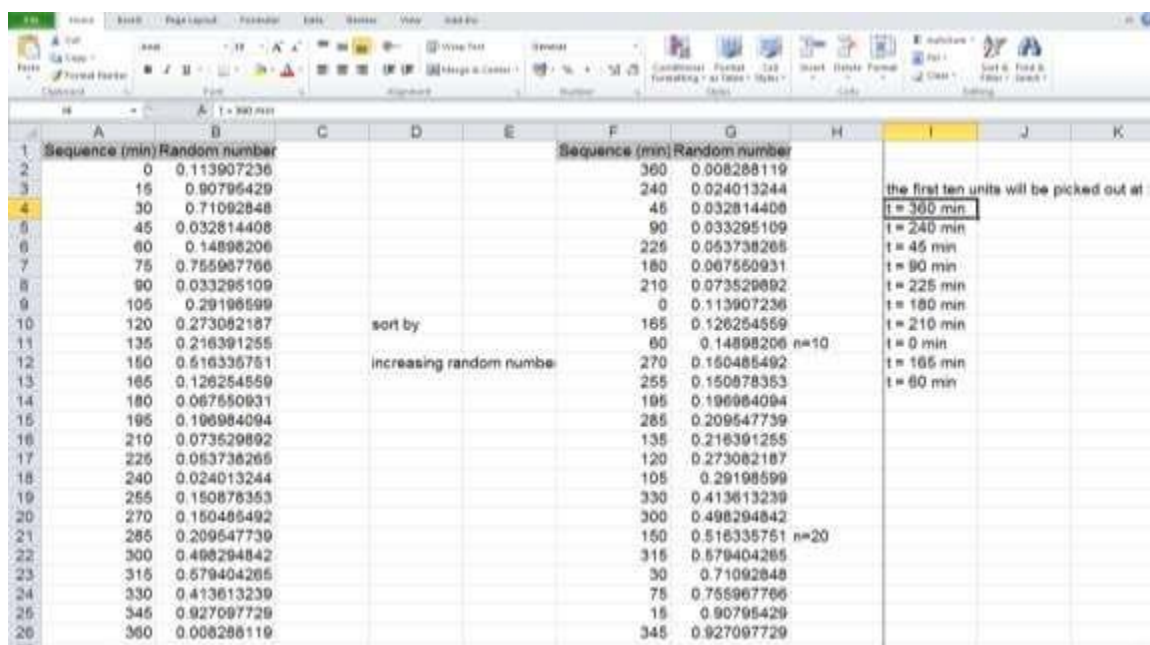
10.15 Pojedyncze losowe pobieranie próbek

Metoda losowania pojedynczej próbki losowej oparta jest na zasadzie ekwiprobabilności. Zasada ta gwarantuje wszystkim jednostkom badanym w partii taką samą szansę wylosowania. Aby spełnić tę zasadę, wielkość partii (N) musi być wystarczająco duża w porównaniu do liczby (n) jednostek testowych: $n / N < 10\%$.

Jednym ze sposobów osiągnięcia prostego losowego pobierania próbek jest ponumerowanie każdej jednostki partii lub, w bardziej praktyczny sposób, "czasu produkcji", a następnie użycie liczb losowych do wybrania wymaganej liczby jednostek testowych. Na przykład, liczby losowe można uzyskać za pomocą arkusza Excel z formułą =RAND() (Rysunek 10), lub z tablic liczb losowych.

Przykład metody stosowanej do losowego wyboru jednostek testowych 10 z partii:

Biorąc pod uwagę, że czas produkcji jednej partii wynosi 6 godzin, te 6 godzin można podzielić na okresy 15 minutowe. Wprowadzając te ciągi do arkusza Excel i używając funkcji losowej można nadać każdej sekwencji losową liczbę.



| Sequence (min) | Random number |
|----------------|---------------|
| 0 | 0.113907236 |
| 15 | 0.90796429 |
| 30 | 0.71092848 |
| 45 | 0.032814408 |
| 60 | 0.14898206 |
| 75 | 0.755967766 |
| 90 | 0.033295109 |
| 105 | 0.29198599 |
| 120 | 0.273082187 |
| 135 | 0.216391255 |
| 150 | 0.516335751 |
| 165 | 0.126254559 |
| 180 | 0.067550931 |
| 195 | 0.196984094 |
| 210 | 0.073529892 |
| 225 | 0.053738265 |
| 240 | 0.024013244 |
| 255 | 0.150878353 |
| 270 | 0.150485492 |
| 285 | 0.209547739 |
| 300 | 0.498294842 |
| 315 | 0.579404265 |
| 330 | 0.413613239 |
| 345 | 0.927097729 |
| 360 | 0.008288119 |

Rysunek 10: Przykład schematu losowego doboru próby z wykorzystaniem arkusza Excel

Te liczby losowe są następnie klasyfikowane według rosnących numerów i wybiera się pierwsze dziesięć z nich. Próbkowanie odbywa się poprzez wybranie dziesięciu jednostek w wybranym czasie, na końcu linii produkcyjnej.