

Vědecký výbor veterinární

Klasifikace: Draft	<input type="checkbox"/>	Pro vnitřní potřebu VVV
Oponovaný draft	<input type="checkbox"/>	Pro vnitřní potřebu VVV
Finální dokument	<input checked="" type="checkbox"/>	Pro oficiální použití
Deklasifikovaný dokument	<input checked="" type="checkbox"/>	Pro veřejné použití

**Metodika provádění studií trvanlivosti pro *Listeria monocytogenes*
u potravin určených k přímé spotřebě**

Garant studie: **MVDr. Josef Brychta, Ph.D.**

Spoluautoři studie: **RNDr. Hana Bulawová**

Listopad 2012

NRL pro *Listeria monocytogenes*, Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93, 586 05,
tel.: +420 567 143 270, E-mail: brychta@svujihlava.cz; bulawova@svujihlava.cz

Souhrn

NRL pro *Listeria monocytogenes* SVS ČR zpracovala metodiku provádění studií trvanlivosti pro *Listeria monocytogenes* u potravin určených k přímé spotřebě. Provádění těchto studií trvanlivosti je definováno v nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005, o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ve znění pozdějších předpisů.

Metodika je určena především pro provozovatele potravinářských podniků (PPP), inspektory příslušných dozorových orgánů a laboratoře, které se budou o provádění těchto studií ucházet.

Cílem této metodiky je, kromě jiného, sjednotit provádění studií pro jednotlivé PPP, umožnit jednotný přístup a vyhodnocení u příslušných inspektorů a stejně kvalitní provedení studie v různých laboratořích.

Při zpracování této metodiky jsme vycházeli především z dokumentu EU Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* „Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods“, Version 2, November 2008, corrected 2009 29/04/2009.

Metodika provedení studie je rozdělena do dvou částí - a) metodika praxe a b) laboratorní provedení. První část metodiky se věnuje možnému členění výrobků u jednotlivých PPP a následnému odběru vzorků k provedení laboratorních testů. Laboratorní část studie detailně popisuje vlastní provedení a rozlišuje dva základní laboratorní mikrobiologické postupy:

a) „Challenge test“ (expoziční test), kde se používají k testování uměle kontaminované vzorky,

a

b) studií trvanlivosti, kde se testují přirozené vzorky bez umělé kontaminace.

V závěru předložené práce jsou uvedena doporučení jak pro PPP, tak pro příslušné dozorové orgány.

Klíčová slova

Listeria monocytogenes, potravina určená k přímé spotřebě, skupiny výrobků, studie trvanlivosti, „Challenge test“ (expoziční test)

Obsah

Souhrn	1
Obsah.....	2
1. Úvod a legislativa.....	3
2. Cíle navržené metodiky	5
3. Metodika	6
3.1. Metodika – praxe (výroba)	6
3.1.1 Příklady možného členění výrobků pro zadání studie	6
3.1.2 Výrobky z masa	6
3.1.3 Mléčné výrobky	7
3.1.4 Rybí výrobky	7
3.1.5 Lahůdky	7
3.2. Metodika – laboratorní část	8
3.2.1 Challenge test (expoziční test).....	8
3.2.1.1 Stanovení růstového potenciálu δ	8
3.2.1.2 Určení maximální růstové rychlosti (μ_{max}).....	15
3.2.2 Studie trvanlivosti	20
3.2.2.1. Metoda vzorkování	20
3.2.2.2. Podmínky uložení.....	20
3.2.2.3. Vhodná metoda stanovení počtu L_m	20
3.2.2.4. Určení maximální růstové rychlosti (μ_{max}).....	21
4. Závěr.....	22
Literatura.....	23

1. Úvod a legislativa

V souvislosti s přijetím evropského potravinového práva a jeho uváděním do praxe byla zdůrazněna výrazným způsobem odpovědnost provozovatelů potravinářských podniků (dále PPP) za vysoký stupeň bezpečnosti jejich produktů a tím i za vysoký stupeň ochrany veřejného zdraví. Kromě jiného je povinností PPP předkládat výsledky prováděných studií trvanlivosti, které jsou nutné k ověřování zdravotní nezávadnosti (bezpečnosti) výrobku po celou dobu jeho údržnosti.

Z hlediska provádění studií je třeba zmínit především nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005, o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ve znění pozdějších předpisů ⁽¹⁾. V tomto nařízení jsou stanovena mikrobiologická kritéria pro určité mikroorganismy a podmínky, které musí PPP provozovatelé potravinářských podniků dodržovat při provádění obecných a zvláštních hygienických opatření podle článku 4 nařízení (ES) č. 852/2004 ⁽²⁾.

Z hlediska obecné bezpečnosti potravin je důležitý odstavec č. 2 preambule nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, kde je uvedeno: „Potraviny nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví“.

Podle článku 3 (obecné požadavky) odstavce č. 2 je uvedeno, že PPP odpovídní za výrobu produktu tzn. výrobci v případě potřeby provádět studie podle přílohy II s cílem prověřit, zda jsou po celou dobu údržnosti dodržována příslušná kritéria.

To se týká zejména potravin určených k přímé spotřebě, které podporují růst *Listeria monocytogenes* a které mohou představovat riziko *Listeria monocytogenes* pro veřejné zdraví.

Potravinářské podniky mohou při provádění těchto studií spolupracovat.

Studie údržnosti potravin podle přílohy II zahrnují:

i) Stanovení vlastností výrobku

Stanovením fyzikálně-chemických vlastností výrobku např. pH, vodní aktivita (a_w), skladovací teplota, obsah solí, koncentrace konzervantů, druh obalového systému, reálná teplota skladování, může výrobce určit, které mikroorganismy včetně patogenních mohou ve výrobku přežít a růst. Výrobce by měl stanovovat fyzikálně-chemické vlastnosti výrobků pravidelně, čímž zohlední variabilitu jednotlivých šarží a v případě *L. monocytogenes* by měl být pomocí získaných údajů schopen dozorovým orgánům doložit, zda výrobek podporuje nebo nepodporuje růst *L. monocytogenes*. Nařízení (ES) 2073/2005 jasně definuje kategorii potravin nepodporující růst *L. monocytogenes* (výrobky s dobou údržnosti < 5 dnů, $\text{pH} \leq 4,4$ nebo $a_w \leq 0,92$, kombinace $\text{pH} \leq 5,0$ a zároveň $a_w \leq 0,94$ a dále výrobky uvedené v poznámce 4, přílohy 1 kapitoly 1 nařízení (ES) č. 2073/2005).

ii) Konzultace dostupné vědecké literatury a údajů z výzkumu, které se týkají vlastností dotčených mikroorganismů, pokud jde o jejich růst a přežívání

Po zjištění fyzikálně-chemických vlastností výrobku by měl výrobce získané hodnoty porovnat s údaji z vědecké literatury a výzkumu ve vztahu k přežití a růstu patogenních mikroorganismů. Srovnáním s údaji z literatury umožňuje výrobcům stanovit, které patogeny mohou přežít a/nebo růst ve výrobku, provést změny ve výrobní technologii, změny surovin/složek, aplikovat přídavek konkurenční mikroflóry (startovací kultury) nebo dalších látek, které zpomalují růst patogenů a tím zvyšují bezpečnost výrobku a prodlužují jeho trvanlivost.

Pokud srovnání údajů z vědecké literatury a specifikace výrobku neposkytuje dostatečné údaje tzn. pro zamýšlenou kombinaci matrice, typ balení, skladování a pravděpodobný výskyt mikroorganismu *L. monocytogenes* nejsou v literatuře uvedeny údaje, které by podpořily odhadnutou délku doby údržnosti výrobku, měly by být provedeny **další upřesňující studie, které mohou zahrnovat některou z níže uvedených možností popř. jejich kombinace.**

iv) Analýza údajů z předcházejícího období

Uchovávání některých záznamů výrobcem vyplývá z legislativy, další záznamy může mít výrobce z vlastních kontrol prováděných v rámci systémů managementu bezpečnosti potravin. Testování finálního výrobku je často prováděno v den výroby a na konci doby údržnosti (DP/DMT) k ověření správného řízení výroby a systémů založených na zásadách HACCP a k ověření vhodnosti stanovené délky doby údržnosti výrobku. Údaje z předcházejícího období mohou poukázat na úroveň kontaminace prostředí a zařízení výroby, surovin a z nich vyrobených potravin, také mohou být výrobcem využity k **analýze trendů** např., zda je úroveň kontaminace *L. monocytogenes* u potravin určených k přímé spotřebě na konci údržnosti trvale nízká či žádná a že žádný ze zjištěných výsledků nepřekročil právní limity. Nicméně pokud údaje z předcházejícího období nejsou z pohledu dozorových orgánů dostatečně průkazné, aby demonstrovaly, že limity stanovené pro *L. monocytogenes* nebudou na konci doby údržnosti překročeny, je **nutné provést laboratorní studie.**

v) Laboratorní studie trvanlivosti

Předkládaný dokument zpracovaný NRL pro *Listeria monocytogenes* se zabývá metodikou provádění laboratorních studií trvanlivosti, který vychází z materiálu EU Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* „Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods“, Version 2, November 2008, corrected 2009 29/04/2009.¹¹

Z praktické zkušenosti a z přehledu Závěrečných zpráv NRL pro *Listeria monocytogenes* (dále jen NRL) však vyplývá, že od doby nabytí platnosti nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 bylo provedeno minimální množství studií. Navzdory tomu, že odborní pracovníci NRL při každé příležitosti vyzývali PPP k plnění této povinnosti.

I když není ze strany výrobců zájem, využila NRL nabídku Vědeckého výboru veterinárního (VVV) při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. (VÚVeL) Brno a předkládá návrh metodiky vypracování laboratorní studie trvanlivosti u potravin určených k přímé spotřebě.

Využití informací uvedených v bodech **i) až iv)** úvodu při stanovení doby údržnosti výrobků je pro výrobce detailně zpracováno v pokynech zpracovaných Evropskou Komisí „Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-lives studies for ready-to-eat food, under Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs“, SANCO/1628/2008 ver. 9.3 a není součástí předkládaného dokumentu.

2. Cíle navržené metodiky

Cílem tohoto dokumentu je:

- 1) Nastavení standardních podmínek při rozhodování PPP při zadávání laboratorních studií trvanlivosti pro *Listeria monocytogenes* u potravin určených k přímé spotřebě.
- 2) Jednotný přístup kontrolních orgánů při kontrole provádění studií a vyhodnocování výsledků.
- 3) Poskytnutí jednotné metodiky laboratořím, které budou mít zájem o provádění laboratorních studií trvanlivosti pro *Listeria monocytogenes*.

3. Metodika

3.1. Metodika – praxe (výroba)

Z původního výkladu příslušných článků nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, které se týkají studií trvanlivosti, i ze souhrnných závěrů příslušné EURL pro *Listeria monocytogenes* vyplývá, že by bylo vhodné provádět příslušné studie zvláště na každý výrobek určený k přímé spotřebě, který PPP uvádí na trh. NRL je však přesvědčena, že tento striktní požadavek je technicky těžko zvládnutelný a finančně pro PPP příliš náročný. Proto se NRL domnívá, že by byl vhodný a dostatečný následující postup:

- 1) Studie by se měly týkat především potravin (výrobků) určených k přímé spotřebě.
- 2) PPP může vycházet z dříve užívaného tradičního dělení výrobků na skupiny dle způsobu výroby – příklady pro masnou výrobu, mléčné výrobky a zpracování ryb jsou uvedeny dále v bodu 3.1.1.
- 3) Na základě analýzy rizika lze z této skupiny vybrat jeden nebo i více výrobků, které se vyrábějí nejčastěji a v nejvyšších objemech. Vždy je nutné vzít v úvahu způsob balení, který zpravidla výrazně ovlivňuje výsledek celé studie trvanlivosti (vakuové balení, ochranná/řízená atmosféra apod.), přítomnost konzervačních látek, přísad konkurenční mikroflóry (startovací kultury) nebo dalších látek, které zpomalují růst patogenů.
- 4) PPP by měl před zahájením studie trvanlivosti vyplnit pravdivě dotazník, který se vztahuje k podmínkám výroby u konkrétního výrobku. Tento dotazník by měla akreditovaná laboratoř, která bude studii provádět, zákazníkovi (výrobci) poskytnout před zpracováním studie. O odběrech šarží vzorků a počtu jednotlivých kusů je vždy nutné se předem dohodnout s laboratoří, která studii bude provádět.
- 5) Studie by se nemusela týkat výrobků ze skupiny pravých konzerv, pokud je splněn požadavek obchodní sterility, který je definován v ČSN 569609 a dříve platné národní legislativě (vyhláška č. 132/2004 Sb. o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení) a měl by být zohledněn v HACCP.¹⁰

3.1.1. Příklady možného členění výrobků pro zadání studie

Každý výrobce si stanoví členění výroby (rozdělení výrobků do skupin) sám. Rozčlenění výrobků do skupin by měla předcházet dohoda s příslušným dozorovým inspektorem SVS ČR či SZPI a akreditovanou laboratoří, která bude studii provádět. Následně uvedený přehled skupin výrobků je tedy pouze orientační, úplný návrh skupin výrobků není podle našeho názoru možný.

3.1.2. Výrobky z masa

Podle stupně zpracování můžeme použít rozdělení masných výrobků na následující skupiny:

- drobné masné výrobky
- měkké salámy
- trvanlivé masné výrobky
- speciální masné výrobky

- vařené masné výrobky
- pečené masné výrobky
- uzená masa
- fermentované výrobky

3.1.3. Mléčné výrobky

- konzumní, pasterované mléko
- kysané tekuté výrobky
- tvarohy
- máslo
- čerstvé sýry
- měkké sýry
- tvrdé sýry
- tavené sýry a pomazánky
- sušená mléka
- plísňové sýry
- strouhané sýry

3.1.4. Rybí výrobky

Základní rozdělení je samozřejmě na ryby mořské a sladkovodní. Pro další rozdělení výrobků můžeme využít například obsah tuku. Rozdělení může být na:

- libové – méně než 2 % tuku (treska, štika, candát, okoun)
- středně tučné – 2 – 10 % tuku (platýz, losos, pstruh, kapr, sumec)
- tučné – více než 10 % tuku (sleď, úhoř, makrela, šprot)
- marinované výrobky
- syrové výrobky k přímému konzumu (sushi ,...)
- speciality

3.1.5. Lahůdky

- saláty s majonézou
- saláty bez majonézy
- rybí saláty
- zeleninové saláty
- aspikové výrobky
- masné výrobky – viz členění u výrobků z masa
- mléčné výrobky
- pomazánky, krémy a pěny
- kusové výrobky s pečivem

3.2. Metodika – laboratorní část

Provádění laboratorních studií trvanlivosti pro *Listeria monocytogenes* u potravin určených k přímé spotřebě.

Tato metodika je přeložena a upravena podle materiálu EU Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* „**TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**“, Version 2, November 2008, corrected 2009 29/04/2009.

Technický dokument EURL pro *L. monocytogenes* (dále jen *Lm*) byl připraven na žádost EC/DG SANCO, aby byly sjednoceny postupy pro provádění studií trvanlivosti pro *Lm* u potravin určených k přímé spotřebě v souladu s kritérii uvedenými v nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 a byl vypracován odborníky EU Community Reference Laboratory for *Lm* ve spolupráci s 10 národními referenčními laboratořemi pro *Lm* členských států EU ⁽⁵⁾.

Tento technický dokument (dále jen dokument) je určen pro laboratoře provádějící studie trvanlivosti pro *Lm* u potravin určených k přímé spotřebě ve spolupráci PPP.

Národní referenční laboratoře pro *Lm* (dále NRL pro *Lm*) mají být nápomocny ostatním laboratořím provádějícím studie nebo mohou samy tyto studie provádět. Dokument poskytuje konkrétní doporučení, jak vybrat, implementovat a provádět jednotlivé mikrobiologické postupy pro hodnocení růstu *Lm* v potravinách určených k přímé spotřebě.

Dokument rozlišuje dva základní mikrobiologické postupy:

- a) „Challenge test“ (expoziční test)
- b) Studie trvanlivosti

3.2.1. „Challenge test“ (expoziční test):

Poskytuje informace o chování *Lm* v uměle kontaminovaných potravinách či surovinách za předem striktně daných podmínek uložení. I když tento test zahrnuje variabilitu matric (použití různých výrobních šarží) i specifickou kontaminaci potraviny (inokulace kmenů izolovaných přímo z potravin), je těžké imitovat úroveň, heterogenitu kontaminace a fyziologický stav bakterií.

Tento test lze provádět dvěma různými metodami:

- a) Stanovení růstového potenciálu δ
- b) Určení maximální růstové rychlosti (μ_{\max})

3.2.1.1. Stanovení růstového potenciálu δ (tj. schopnost *Lm* růst v testované potravine)

Jedná se o laboratorní studii založenou na stanovení růstu *Lm* v uměle kontaminovaných vzorcích potravin, uložených za podmínek, které realisticky odrážejí podmínky chladicího řetězce pro danou potravinu od výroby po spotřebu.

Růstový potenciál δ je maximální rozdíl mezi hodnotou log KTJ/g na konci testu (na konci doby trvanlivosti) a hodnotou log KTJ/g na začátku testu (po umělé kontaminaci) a závisí na těchto faktorech:

- Inokulované kmeny *Lm*
- Fyziologický stav inokulovaných kmenů
- Vnitřní charakteristika potraviny (pH, obsah soli, nutriční složení, doprovodná mikroflóra, antimikrobiální látky)
- Vnější charakteristika potraviny (časově – teplotní profil, ochranná atmosféra)

Při provedení tohoto testu je třeba respektovat tyto dílčí body:

3.2.1.1.1. Charakteristika produktu

Reprezentativní a dostatečně variabilní. Zahrnuje fyzikálně chemické vlastnosti (pH, a_w , obsah soli, koncentrace konzervantů), určení doprovodné mikroflóry (celkový počet mikroorganismů) a specifické mikroflóry (bakterie mléčného kvašení, bakterie rodu *Pseudomonas* atd.), podmínky balení produktu (vzduch, vakuum, ochranná atmosféra atd.)

3.2.1.1.2. Doba trvanlivosti

Předem definovaná jako doporučená doba spotřeby

3.2.1.1.3. Počet šarží (várek)

Musí být testovány vždy nejméně 3 šarže jednoho produktu

3.2.1.1.4. Výběr kmenů *Lm*

Směs nejméně 3 kmenů. Jeden musí být referenční (ze sbírky mikroorganismů CCM, ATCC, NCTC, CIP apod.), další dva by měly být izolovány ze stejného nebo podobného druhu výrobku, ze stejné výroby apod.

3.2.1.1.5. Příprava inokula

Před vlastním testováním je třeba určit čas, který jednotlivé kmeny potřebují k dosažení stacionární fáze růstu. Každý kmen se subkultivuje v médiu Trypton Soya Broth (dále TSB) nebo v Brain Heart Infusion (dále BHI) při teplotě 37 °C do časné stacionární fáze růstu. Druhé subkultury kmenů se inkubují do pozdní exponenciální nebo časné stacionární fáze růstu při teplotě, která co nejvíce odpovídá teplotě uložení výrobku během doby trvanlivosti, aby se kmeny adaptovaly na tuto teplotu. Z těchto druhých subkultur se připraví směs, kde jsou ve stejné koncentraci zastoupeny všechny 3 kmeny. Z této směsi se vytvoří následným ředěním ve fyziologickém roztoku pracovní kultura o koncentraci, kterou lze reálně očekávat při manipulaci s výrobkem. Koncentrace pracovní kultury se musí zkontrolovat výsevem na TSB ⁽⁶⁾.

3.2.1.1.6. Příprava a inokulace testovaných jednotek

Minimální počet testovaných jednotek produktu na jednu výrobní šarži je přehledně uveden v následující tabulce.

	den 0	konec
Určení koncentrace <i>Lm</i> po umělé kontaminaci	3	3
Detekce (příp. stanovení počtu) <i>Lm</i> v přirozených vzorcích bez umělé kontaminace ⁽⁷⁾	3	3
Vyšetření fyzikálně chemických parametrů	1 - 3*	1 - 3*
Určení koncentrace doprovodné mikroflóry	3	3

První sloupec „den 0“ – čas ihned po inokulaci jednotek

Druhý sloupec „konec“ – konec doby spotřeby

*Při stanovení fyzikálně chemických parametrů lze vyšetřit pouze 1 jednotku, pokud výrobce doloží, že testovaný produkt je homogenní.

Podle délky doby trvanlivosti lze libovolně přidat mezi testováním na začátku a na konci doby spotřeby ještě další analýzy v jiné dny.

Jednotky bez umělé kontaminace se testují jako tzv. „blank“ vzorky. I když je *Lm* přítomna v těchto přirozených vzorcích v nízkých koncentracích, jsou výsledky validní.

Jednotky určené pro vyšetřování fyzikálně chemických parametrů a doprovodné mikroflóry se uměle nekontaminují, ale pouze injektují sterilním fyziologickým roztokem. Vyšetření těchto parametrů a doprovodné mikroflóry je nutné k závěrečnému posouzení, neboť může docházet k ovlivnění růstu *Lm*.

Testované jednotky mohou představovat buď dílčí části většího balení, nebo jednotlivá maloobchodní balení produktu. Pokud se výrobek skládá z více částí, uměle se kontaminuje pouze ta část, která by mohla být kontaminována přirozenou cestou (např. náplň u baget a sendvičů). Vlastní umělá kontaminace a distribuce inokula by měla co nejvíce odpovídat reálným podmínkám výroby. U relativně homogenních výrobků můžeme inokulovat kmeny *Lm* dovnitř (sekané, mleté maso a suroviny, míchané saláty). U ostatních musíme brát v úvahu kritické body při výrobě či zpracování a inokulujeme např. na povrch (uzený losos, plátky uzenin). Objem inokula by neměl přesáhnout 1 objemové %, aby nebyla změněna vnitřní charakteristika výrobku. Je třeba také zajistit, aby inokulace nezměnila složení ochranné atmosféry u balených produktů po celou dobu trvanlivosti. Inokulace se může provádět přes speciální septum, které se po vytažení inokulační jehly ihned zacelí nebo se inokulované jednotky znovu přebalí do ochranné atmosféry o původním složení. Výrobky balené ve vakuu se po inokulaci opět přebalí do vakua.

Cílová hodnota kontaminace výrobku by měla být cca 50 KTJ/g, nesmí překročit 100 KTJ/g.

3.2.1.1.7. Podmínky uložení (inkubace)

Je třeba zvolit tak, aby odpovídaly co nejvíce podmínkám, kterým je vystaven běžný produkt od výroby až po spotřebu. To znamená, že musí být respektovány typické teploty, při kterých je produkt transportován, distribuován a uchováván. **Toto je kritická část metody a PPP musí spolu s laboratoří realisticky nastavit tyto podmínky během celého pokusu, aby nedošlo ke zneužití a podhodnocení.**

Na základě dostupných informací, které zohledňují nejen výrobu a distribuci, ale i maloobchodní podmínky, byla vytvořena následující tabulka jako základní vodítko:

Stádium chladicího řetězce	Teplota (inkubační teplota)	Počet dnů uložení (inkubace)	
		doba spotřeby ≤ 21 dní	doba spotřeby ≥ 21 dní
Transport od výroby do obchodu	Teplota odůvodněná nebo* 8 °C detailními informacemi PPP	Doba uložení odůvodněná nebo** 1/3 detailními celkové informacemi doby PPP spotřeby	7 dní
Obchod – vystavení výrobku v chladicí vitríně	Teplota odůvodněná nebo* 12 °C detailními informacemi PPP	Doba uložení odůvodněná nebo** 1/3 detailními celkové informacemi doby PPP spotřeby	1/2 (doba spotř. – 7 dní)
Uchování u zákazníka – do spotřeby	Teplota odůvodněná nebo* 12 °C detailními informacemi PPP	Doba uložení odůvodněná nebo** 1/3 detailními celkové informacemi doby PPP spotřeby	1/2 (doba spotř. – 7 dní)

*jiná hodnota teploty není známa

**jiná doba uložení není doložena

3.2.1.1.8. Měření fyzikálně chemických parametrů

pH, obsah soli, a_w , popř. vlhkost nebo sušina (podle standardních metod)

3.2.1.1.9. Mikrobiologické analýzy

Referenční metoda EN ISO 11290 – 1, 2 (viz Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005) ^(7, 8).

Pokud by byly použity jiné alternativní metody, musí být validovány ve srovnání s referenční metodou.

V testu se stanovují nízké počty. Citlivost metody stanovení počtu lze zvýšit použitím roztěru základní suspenze na více misek s ALOA médiem (např. při roztěru 2 x 1 ml na 6 misek o průměru 90 mm dosáhneme snížení limitu z 10 KTJ/g na 5 KTJ/g).

Pouze jeden ze tří výsledků počtu *Lm* pro jednotlivou šarži v den 0 (po umělé kontaminaci) může být pod limitem (< 10 KTJ/g nebo < 5 KTJ/g). Jsou-li 2 nebo 3 takové výsledky, studie není validní. Doporučuje se rovněž vypočítat standardní odchylku⁽⁹⁾ log KTJ/g při stanovení počtu *Lm* v den 0 pro každou šarži testovacích jednotek. Je-li standardní odchylka ≥ 0,3 log KTJ/g, studie není akceptovatelná.

Při stanovení doprovodné mikroflóry (celkový počet mikroorganismů, počet bakterií mléčného kvašení apod.) se postupuje dle příslušných standardních ISO metod.

3.2.1.1.10. Výpočet růstového potenciálu

Provádí se testování nejméně 3 šarží produktu. Z každé šarže se nejméně 6 vzorků daného výrobku uměle kontaminuje. U 3 vzorků se provede stanovení počtu *Lm* (v den 0) a další tři se inkubují za vhodných podmínek (viz výše) a vyšetří se až na konci doporučené doby spotřeby. Hodnoty KTJ/g se vyjádří jako log KTJ/g, určí se medián těchto hodnot. Medián je prostřední hodnota ze 3 výsledků. Pokud je jeden výsledek vyjádřen pod limitem (< 10 KTJ/g nebo < 5 KTJ/g), použije se nižší hodnota ze 2 výsledků. Pro každou šarži se vypočítá diference mediánů hodnot log KTJ/g na konci doby spotřeby a po umělé kontaminaci (v den 0).

Růstový potenciál δ je maximální hodnota těchto rozdílů pro minimálně 3 testované šarže produktu. V rámci vlastní aplikace tohoto parametru (dle nařízení Komise (ES) č. 2073/2005) lze klasifikovat potraviny na:

- Potraviny určené k přímé spotřebě, **kteře jsou schopny podporovat růst *Lm***, jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely, jestliže hodnota růstového potenciálu $\delta > 0,5 \log_{10} \text{KTJ/g}$.
- Potraviny určené k přímé spotřebě, **kteře nejsou schopny podporovat růst *Lm***, jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely, jestliže hodnota růstového potenciálu $\delta \leq 0,5 \log_{10} \text{KTJ/g}$.

Hlavní výhodou této metody je relativně jednoduchá implementace a vlastní provedení.

Nevýhodou je nízká flexibilita při vlastní interpretaci výsledků.

Výsledky jsou validní pouze pro konkrétní výrobek za přesně definovaných podmínek. Jakákoli změna ve výrobě, v receptuře, v době trvanlivosti, v balení nebo v časově – teplotním profilu již nemůže být akceptována a musí následovat provedení nové studie.

3.2.1.1.11. Využití hodnoty růstového potenciálu

Příklady:

1) Hodnota růstového potenciálu δ je $< 0,5 \log_{10} \text{KTJ/g}$

Šarže výrobku	Den vyšetření	Koncentrace (KTJ/g)	Koncentrace ($\log_{10} \text{KTJ/g}$)	Diference mediánů ($\log_{10} \text{KTJ/g}$)	Růstový potenciál δ
1	0	30	1,48	1,46 – 1,48 = -0,02	
		50	1,70		
		20	1,30		
	konec	43	1,63		
		24	1,38		
		29	1,46		
2	0	45	1,65	1,46 – 1,48 = -0,02	0,42
		30	1,48		
		30	1,48		
	konec	29	1,46		
		43	1,63		
		14	1,15		
3	0	<5	<0,70	1,72 – 1,30 = 0,42	
		25	1,40		
		20	1,30		
	konec	52	1,72		
		38	1,58		
		81	1,91		

Zvýrazněné hodnoty $\log_{10} \text{KTJ/g}$ – mediány

Limit stanovení počtu $L_m = 5 \text{KTJ/g}$

Standardní odchylky výsledků v den 0 pro šarže 1 – 3:

0,20 $\log \text{KTJ/g}$

0,10 $\log \text{KTJ/g}$

0,07 $\log \text{KTJ/g}$

Produkt patří mezi potraviny určené k přímé spotřebě, které nejsou schopny podporovat růst L_m

2) Hodnota růstového potenciálu δ je $\approx 0,5 \log_{10} \text{KTJ/g}$

Šarže výrobku	Den vyšetření	Koncentrace (KTJ/g)	Koncentrace ($\log_{10} \text{KTJ/g}$)	Diference mediánů ($\log_{10} \text{KTJ/g}$)	Růstový potenciál δ
1	0	25	1,40	2,28 – 1,40 = 0,88	0,88
		20	1,30		
		55	1,74		
	konec	190	2,28		
		100	2,00		
		210	2,33		
2	0	60	1,78	2,54 – 1,70 = 0,84	0,88
		30	1,48		
		50	1,70		
	konec	250	2,40		
		350	2,54		
		390	2,59		
3	0	20	1,30	1,72 – 1,30 = 0,42	0,88
		25	1,40		
		20	1,30		
	konec	43	1,63		
		52	1,72		
		76	1,88		

Zvýrazněné hodnoty $\log_{10} \text{KTJ/g}$ – mediány

Limit stanovení počtu $L_m = 5 \text{KTJ/g}$

Standardní odchylky výsledků v den 0 pro šarže 1 – 3:

0,23 $\log \text{KTJ/g}$
0,16 $\log \text{KTJ/g}$
0,06 $\log \text{KTJ/g}$

Produkt patří mezi potraviny určené k přímé spotřebě, které jsou schopny podporovat růst L_m

Závěrečné shrnutí příkladů využití:

Tato metoda umožňuje předpověď růstu L_m v daném výrobku.

Platí rovnice:

finální koncentrace = počáteční koncentrace + δ

počáteční koncentrace = finální koncentrace – δ

V praxi např. známe-li počáteční koncentraci L_m ve výrobku a hodnotu růstového potenciálu, můžeme podle první rovnice zjistit, zda nebude na konci doby spotřeby překročen limit 100 KTJ/g.

3.2.1.1.12. Výsledná zpráva z laboratorní studie

Výsledná zpráva z laboratorní studie musí zahrnovat následující informace:

- Podrobné informace o potravíně (surovinách)
 - popis jednotlivých šarží, data výroby
 - charakteristika (pH, a_w , doprovodná mikroflóra)
 - doba trvanlivosti
- Nastavení podmínek uložení (čas a teplota)
- Hodnocení kmenů *Lm* použitých k umělé kontaminaci
 - původ kmenů
 - podmínky přípravy inokula
 - koncentrace inokula
- Hodnocení testu stanovení růstového potenciálu δ
 - počet šarží
 - počet testovaných jednotek
 - den inokulace
 - hmotnost nebo objem testovaných jednotek
 - objem inokula
 - podmínky uložení testovaných jednotek
 - odkaz na metody testování
 - limit metody stanovení počtu
 - fyzikálně chemické parametry na začátku a na konci testování
 - úroveň doprovodné mikroflóry na začátku a na konci testování
 - výsledky a kalkulace
 - interpretace růstového potenciálu

3.2.1.2 Určení maximální růstové rychlosti (μ_{max})

Nevýhody předchozího testu mohou být řešeny kombinací modelů prediktivní mikrobiologie a expozičního testu. Tyto testy jsou však mnohem dražší, časově náročnější než stanovení růstového potenciálu a musí být prováděny na specializovaných pracovištích, která jsou vybavena k provádění testů prediktivní mikrobiologie. Vzhledem k náročnosti tohoto experimentu je třeba předem zvážit jeho implementaci a provádět jej jen v opodstatněných případech.

Tato laboratorní studie měří rychlost růstu *Lm* v uměle kontaminovaných vzorcích potravin uložených za určitých podmínek. Teplota uložení v tomto experimentu není určující, protože je možné předpovídat růst i při jiné teplotě než byla použita ve vlastním testování nebo dokonce v souladu s časově – teplotním profilem tuto teplotu měnit podle konkrétních podmínek transportu, distribuce a uložení.

Maximální růstová rychlost se počítá z růstové křivky kmene *Lm* při určité teplotě v exponenciální fázi růstu. Grafické znázornění přirozeného logaritmu počtu buněk ($\ln X$) v čase vytvoří přímku. Sklon této přímky představuje maximální růstovou rychlost (μ_{max}).

Maximální růstová rychlost (μ_{\max}) závisí na mnoha faktorech:

- Inokulované kmeny *Lm*
- Vnitřní charakteristika potraviny (pH, a_w , obsah soli, nutriční složení, doprovodná mikroflóra, antimikrobiální látky)
- Vnější charakteristika potraviny (časově – teplotní profil, způsob balení)

Při provedení tohoto testu je třeba respektovat tyto dílčí body:

3.2.1.2.1. Charakteristika produktu – viz 3.2.1.1.1.

3.2.1.2.2. Doba trvanlivosti – viz 3.2.1.1.2.

3.2.1.2.3. Počet šarží (várek) – viz 3.2.1.1.3.

3.2.1.2.4. Výběr kmenů *Lm*

Pro každou šarži je třeba testovat 2 kmeny separátně. Jeden musí být referenční (ze sbírky mikroorganismů CCM, ATCC, NCTC, CIP apod.), další by měl být izolován ze stejného nebo podobného druhu výrobku, ze stejné výroby apod. Před vlastním provedením tohoto testu je třeba stanovit růstové křivky kmenů, aby byly vybrány a dále testovány 2 nejrychlejší kmeny.

3.2.1.2.5. Příprava inokula

Počáteční koncentrace *Lm* může být vyšší, než je očekávaná koncentrace v produktu. Před vlastním testováním je třeba určit čas potřebný k dosažení stacionární fáze růstu. Každý kmen se subkultivuje v médiu TSB nebo v BHI při teplotě 37 °C do časné stacionární fáze růstu. Druhá subkultivace probíhá za stejných podmínek.

3.2.1.2.6. Příprava a inokulace testovaných jednotek

Minimální počet testovacích jednotek produktu na jednu růstovou křivku je přehledně uveden v následující tabulce.

	Testované jednotky
Určení μ_{\max} (růstová křivka)	10 až 15
Detekce <i>Lm</i> v produktu před provedením testu (den 0) a stanovení počtu <i>Lm</i> na konci testu	3 + 3
Vyšetření fyzikálně chemických parametrů na počátku (den 0) a na konci testu	3 + 3*
Určení koncentrace doprovodné mikroflóry	2

*Při stanovení fyzikálně chemických parametrů lze vyšetřit pouze 1 jednotku, pokud výrobce doloží, že testovaný produkt je homogenní

Testované jednotky mohou představovat buď dílčí části většího balení, nebo jednotlivá maloobchodní balení produktu. Pokud se výrobek skládá z více částí, uměle se kontaminuje pouze ta část, která by mohla být kontaminována přirozenou cestou. Vlastní umělá kontaminace a distribuce inokula by měla co nejvíce odpovídat reálným podmínkám výroby.

Pro každou růstovou křivku se inokulují testované jednotky pouze jedním kmenem *Lm* (ne směsí kmenů). Ostatní – viz 3.2.1.1.6.

Cílová hodnota kontaminace by měla být cca 100 KTJ/g.

Detekce *Lm* v produktu před provedením „challenge testu“ (den 0) a stanovení počtu *Lm* na konci testování se provádí dle následujícího postupu:

Připraví se 6 testovacích jednotek bez umělé kontaminace (tzv. „blank“ vzorky). Nejprve se otestují 3 jednotky na nepřítomnost *Lm*. Je-li v těchto vzorcích detekována *Lm*, nelze test provést, protože není přesně znám počet *Lm* a nelze správně stanovit růstovou křivku. Výsledky stanovení počtu *Lm* na konci testu v dalších 3 vzorcích musí být interpretovány v laboratoři.

Vyšetření fyzikálně chemických parametrů se provádí u testovaných jednotek, které nejsou inokulovány *Lm*, ale pouze injektovány sterilním fyziologickým roztokem (viz. 3.2.1.1.6.).

3.2.1.2.7. Podmínky uložení inokulovaných vzorků - viz 3.2.1.1.7.

Tento test se provádí při fixní teplotě uložení, která je podobná teplotám v tabulce 3.2.1.1.7.

3.2.1.2.8. Měření fyzikálně chemických parametrů – viz 3.2.1.1.8.

3.2.1.2.9. Mikrobiologické analýzy

Referenční metoda EN ISO 11290 – 1, 2 (viz nařízení Komise (ES) č. 2073/2005).

Pokud by byly použity jiné alternativní metody, musí být validovány ve srovnání s referenční metodou.

Při stanovení doprovodné mikroflóry (celkový počet mikroorganismů, počet bakterií mléčného kvašení apod.) se postupuje dle příslušných standardních ISO metod.

3.2.1.2.10. Výpočet maximální růstové rychlosti

Stanoví se počty *Lm* v KTJ/g a převedou se na hodnoty log KTJ/g. Růstová rychlost každé křivky se potom odvodí z experimentálních dat pomocí nelineární regrese. K tomu lze využít např. software Micro-Fit, který je založen na Baranyho primárním modelu.

Tento software poskytne graf z experimentálních hodnot a regresí s použitím Baranyho modelu. Z křivky jsou také odvozeny další parametry:

N_0 : logaritmus počáteční koncentrace bakterií

N_{max} : logaritmus finální koncentrace bakterií

μ_{max} : maximální růstová rychlost

t-lag: lag time

t-d: generační čas

platí rovnice: $t-d = \ln 2 / \mu_{max}$, kde ln je přirozený logaritmus, lag time je vyjádřen ve dnech a μ_{max} se vyjadřuje v jednotkách den^{-1}

Hodnoty parametrů jsou vyjadřovány vždy spolu s konfidenčním intervalem.

Jako reprezentativní parametr se vybírá maximální hodnota ze 6 μ_{max} , které byly získány z každé z 6 růstových křivek (vždy 2 růstové křivky pro 2 kmeny *Lm* na jednu šarži produktu).

3.2.1.2.11. Využití výsledků μ_{\max}

Jestliže známe parametr μ_{\max} při určité (referenční teplotě) T_{ref} , můžeme spočítat jinou hodnotu μ_{\max} při jiné teplotě T .

Když hodnotu μ_{\max} získanou při referenční teplotě T_{ref} označíme $\mu_{\max(\text{ref})}$, potom platí pro hodnotu μ_{\max} při jiné teplotě T rovnice:

$$\mu_{\max} = \mu_{\max(\text{ref})} \cdot \frac{(T - T_{\min})^2}{(T_{\text{ref}} - T_{\min})^2}$$

T a T_{ref} musí být menší než $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a hodnota T_{\min} (minimální teplota růstu) pro Lm je $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hodnoty μ_{\max} a $\mu_{\max(\text{ref})}$ mohou být vyjádřeny v hodnotách \log KTJ/g na den, jestliže převedeme údaj \ln na \log vydělením hodnotou 2,3.

Tato metoda umožňuje předpověď růstu pro jakýkoliv časově – teplotní profil.

Příklad:

Doba trvanlivosti výrobku: 9 dní

Podmínky uložení výrobku: $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 3 dny (d_1) a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 6 dnů (d_2)

Test byl proveden při $T_{\text{ref}} = 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zjištěná hodnota $\mu_{\max(\text{ref})} = 0,78 \ln$ KTJ/g

(lze přetransformovat na $0,34 \log$ KTJ/g)

1) Chceme znát μ_{\max} při $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$

$$\text{Podle předchozího vzorce platí: } 0,78 \cdot \frac{(4 - (-2))^2}{(8 - (-2))^2} = 0,28 \ln \text{ KTJ/g na den}$$

(lze přetransformovat na $0,12 \log$ KTJ/g)

Růstová rychlost při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je $0,12 \log$ KTJ/g na den.

2) Jaký bude růst během celé doby trvanlivosti?

$$\mu_{\max 1} \cdot d_1 + \mu_{\max 2} \cdot d_2$$

při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ při $8\text{ }^{\circ}\text{C}$

$$0,12 \cdot 3 + 0,34 \cdot 6 = 2,40 \log \text{ KTJ/g (kalkulace nezahrnuje lag fázi a stacionární fázi, simulace vychází z exponenciální fáze růstu)}$$

3) Jaká musí být koncentrace na začátku doby trvanlivosti, aby po celou dobu nebyl překročen limit 100 KTJ/g ?

Počáteční koncentrace = Finální koncentrace – růst během doby spotřeby

Limit finální koncentrace je $100 \text{ KTJ/g} = 2 \log \text{ KTJ/g}$

$$\text{Počáteční koncentrace} = (2 - 2,4) \log \text{ KTJ/g} = -0,4 \log \text{ KTJ/g} = 0,4 \text{ KTJ/g}$$

4) Jaká je koncentrace na konci doby spotřeby, jestliže je ve výrobku 7. den hodnota 1,65 log KTJ/g?

Dále počítáme s hodnotou $\mu_{\max} = 0,34$ log KTJ/g pro $T = 8$ °C ještě další 2 dny

$$1,65 + 0,34 \cdot 2 = 2,33 \text{ log KTJ /g}$$

Limit 100 KTJ/g (hodnota 2 log KTJ/g) bude překročen.

Závěrečné shrnutí příkladů využití:

Tato metoda umožňuje:

Odhad koncentrace L_m v určitý den během doby spotřeby, jestliže je známa počáteční koncentrace.

Odhad maximální povolené koncentrace L_m v den výroby tak, aby nebyl překročen limit 100 KTJ/g na konci doby spotřeby.

Závěry jsou však vždy platné jen pro určitý výrobek, který byl takto testován.

3.2.1.2.12. Výsledná zpráva z laboratorní studie

Výsledná zpráva z laboratorní studie musí zahrnovat následující informace:

- Podrobné informace o potravině (surovině)
 - popis jednotlivých šarží, data výroby
 - charakteristika (pH, a_w , doprovodná mikroflóra)
- Hodnocení kmenů L_m použitých k umělé kontaminaci
 - původ kmenů
 - podmínky přípravy inokula
 - koncentrace inokula
- Hodnocení testu stanovení maximální růstové rychlosti
 - počet šarží
 - počet testovaných jednotek
 - den inokulace
 - hmotnost nebo objem testovaných jednotek
 - objem inokula a metoda kontaminace
 - podmínky uložení testovaných jednotek (čas / teplota)
 - odkaz na metody testování
 - limit metody stanovení počtu
 - fyzikálně chemické parametry na začátku a na konci testování
 - úroveň doprovodné mikroflóry na začátku a na konci testování
 - výsledky a kalkulace
 - interpretace růstového potenciálu

3.2.2. Studie trvanlivosti

Pomocí této metody se testuje růst L_m v přirozeně kontaminovaných vzorcích potravin během jejich uložení podle předem daných podmínek. Studie trvanlivosti odráží lépe realistické podmínky v potravině než testování uměle kontaminovaných vzorků, ale interpretace výsledků, tak aby byl dodržen limit ≤ 100 KTJ/g po celou dobu trvanlivosti, je poměrně obtížná vzhledem k velmi nízké úrovni kontaminace potravin v den výroby, k heterogenitě této kontaminace a k náhodnému výběru vzorků pro testování.

Studie trvanlivosti závisí především na těchto faktorech:

- Metoda vzorkování
- Podmínky uložení
- Vhodná metoda stanovení počtu L_m

3.2.2.1. Metoda vzorkování

Vzorkování musí být reprezentativní a musí zahrnovat všechny faktory ovlivňující diverzitu. Velikost testované subpopulace závisí na objemu výroby daného produktu. Vzorkování je na zodpovědnosti PPP, který ve spolupráci s laboratoří volí vhodnou techniku.

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 se odkazuje v Anexu I na platnou ISO normu a na pokyn Codex Alimentarius (CAC/GL 50 – 2004 „General guidelines on sampling“), které mají být použity jako referenční metody vzorkování v případě, že nejsou k dispozici přesnější pravidla vzorkování a přípravy testovaných vzorků.

Jestliže nejsou žádné bližší informace o struktuře populace vzorků, neobjektivnější způsob je použít metodu náhodného vzorkování. Základním principem je dát každému vzorku stejnou šanci, aby byl vybrán.

Způsob, jak dosáhnout náhodného vzorkování, je očíslovat jednotky produktu nebo jednotlivé časy výroby (např. v intervalu 5 minut) a poté použít výběr náhodných čísel např. pomocí tabulkového procesoru EXCEL, vzorce pro náhodná čísla = RAND ().

3.2.2.2. Podmínky uložení

Testované jednotky se odebírají na konci výrobní linky a ukládají se v laboratoři za daných podmínek, viz 3.2.1.1.7.

3.2.2.3. Vhodná metoda stanovení počtu L_m

Na konci doby spotřeby se u testovaných jednotek stanoví počet L_m v KTJ/g a vyhodnotí se, jestli byla překročena hodnota 100 KTJ/g.

Jako referenční metoda je stanovena EN ISO 11290 – 2 (nařízení Komise (ES) č. 2073/2005). Pokud by byly použity jiné alternativní metody, musí být validovány ve srovnání s referenční metodou. Limit kvantifikace musí být 10 KTJ/g.

Pro odhadovaný podíl p jednotek s počtem $L_m \geq 100$ KTJ/g platí:

$$p = r / n$$

n = počet testovaných jednotek

r = počet testovaných jednotek s výsledkem ≥ 100 KTJ/g

k podílu p je třeba ještě vypočítat konfidenční interval

Následující tabulka dokládá, jak zvolený počet testovaných jednotek může ovlivnit konfidenční interval podílu p:

n počet testovaných jednotek	r počet jednotek s \geq 100 KTJ/g	p odhad. podíl	konfidenční interval při 95 %
20 100	0	0% 0%	[0% - 16%] [0% - 4%]
20 100	1	5% 1%	[1% - 24%] [0,2% - 5%]
20 100	2	10% 2%	[3% - 30%] [0,6% - 7%]

Čím více jednotek je testováno, tím je užší konfidenční interval.

3.2.2.4. Výsledná zpráva z laboratorní studie

Výsledná zpráva z laboratorní studie musí zahrnovat následující informace:

- Podrobné informace o potravíně (surovinách)
 - popis jednotlivých šarží, data výroby
 - charakteristika (pH, a_w , doprovodná mikroflóra)
 - doba trvanlivosti
- Nastavení podmínek uložení (čas a teplota)
- Hodnocení studie trvanlivosti
 - počet šarží
 - počet testovaných jednotek
 - dny vzorkování testovaných jednotek
 - datum uložení (začátku)
 - podmínky uložení testovaných jednotek
 - odkaz na metody testování
 - limit metody stanovení počtu
 - výsledky a kalkulace odhadovaného podílu p na konci doby trvanlivosti
 - konfidenční interval

Výběr vhodné metody testování zvolí PPP ve spolupráci s laboratoří, která bude studii provádět podle níže uvedených pravidel:

- „Challenge test“ (expoziční test) pro stanovení růstového potenciálu by měl být metodou první volby ve většině případů, aby bylo zjištěno, zda produkt patří do skupiny potravin podporujících růst *Lm* nebo nepodporujících růst *Lm*
- Určení maximální růstové rychlosti (μ_{max}) by mělo být zvažováno pouze ve specifických případech, kdy by bylo vhodné získat další užitečné informace. Pro interpretaci výsledků je nutná znalost prediktivní mikrobiologie.
- Studie trvanlivosti jsou vhodné v případě, že je vysoká prevalence *Lm*.

4. Závěr

- Pokud jsou v potravinách určených k přímé spotřebě zjištěny mikroorganismy druhu *L. monocytogenes*, jsou tyto nálezy podle nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ve znění pozdějších předpisů, hodnoceny jako nevyhovující.
- Na základě výsledků NRL pro *Lm* jsou nevyhovující výsledky vyšetření prokazovány jak u výrobků podporujících růst *L. monocytogenes* (0,9 % v roce 2010 – a 2,5 % v roce 2011) – tak u výrobků nepodporujících růst *L. monocytogenes* (4,8 % v roce 2010 a 6,6 % v roce 2011).
- Podle článku 3 odst. 2 PPP odpovědni za výrobu, musejí v případě potřeby provádět studie trvanlivosti a ověřovat tak svá tvrzení o bezpečnosti výrobků, které uvádějí na trh. To se týká zejména potravin určených k přímé spotřebě, které podporují růst *L. monocytogenes*, a které mohou představovat riziko *L. monocytogenes* pro veřejné zdraví.
- PPP mají za povinnost sledovat trendy.
- Výrobci dosud zadávají vypracování laboratorních studií trvanlivosti u svých produktů zcela ojediněle. Je proto třeba neustále zdůrazňovat PPP nutnost ověřovat zdravotní nezávadnost výrobků po celou dobu údržnosti, čehož lze dosáhnout zpracováním vhodné laboratorní studie a následným využitím systému vnitřní kontroly.

Literatura:

1. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005, O mikrobiologických kritériích pro potraviny. Úřední věstník. L 139, 30. 4. 2004, s. 1 (v platném znění)
2. Nařízení č. 852/2004/ES ze dne 29. dubna 2004 O hygieně potravin. Úřední věstník. L 139. 2004, s. 1 (v platném znění)
3. Výroční zpráva NRL pro *Listeria monocytogenes*, 2011. SVÚ Jihlava, únor 2012
4. Výroční zpráva NRL pro *Listeria monocytogenes*, 2010. SVÚ Jihlava, únor 2011
5. EU Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* : Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food, Version 2, November 2008
6. ČSN ISO 7218 (2007) Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení
7. ČSN EN ISO 11290-1 (1999) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 1: Metoda průkazu, Změna A1 (2005)
8. ČSN EN ISO 11290-2 (1999) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 2: Metoda stanovení počtu, Změna A1 (2005)
9. ČSN P ISO/TS 19036 (2007) Mikrobiologie potravin a krmiv – Pokyny pro odhad nejistoty měření při kvantitativním stanovení
10. ČSN 569609
11. Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-lives studies for ready-to-eat food, under Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs“, SANCO/1628/2008 ver. 9.3.