



LABRIS



Euroopa Maaelu Arengu
Põllumajandusfond:
Euroopa investeringud
maapiirkondadesse

Säilimisaja määramisel kasutatavates nakatamiskatsete ja prognoosmudelite kasutamise võimalustest

Maiu Kuningas, LABRIS mikrobioloogia osakonna juhataja

Kristjan Soo, LABRIS mikrobioloogia osakonna peaspetsialist

Infopäev, 06.04.2023

Seadusandlus

- Komisjoni määrus (EÜ) nr 2073/2005 artikkel 3 lõige 2

Toote valmistamise eest vastutavad toidukäitlejad korraldavad vajadusel uuringuid II lisa kohaselt, et uurida kriteeriumidele vastavust kogu kõlblikkusaja jooksul.

Eriti kehtib see valmistoitude kohta, mille puhul on soodustatud *Listeria monocytogenes*'e bakterite teke, mis võib põhjustada *Listeria monocytogenes*'e ohtu rahva tervisele.

„Põhjendatult eeldatavad tingimused“ on määruse (EÜ) nr 2073/2005 kohaselt „jaotamis-, ladustamis- ja kasutustingimused“, millega toit tõenäoliselt kokku puutub, kui see on toidukäitleja vahetu kontrolli alt välja viidud, ja mida tuleb kõlblikkusaja kehtestamisel arvesse võtta.

Seadusandlus

- Määrus (EÜ) nr 2073/2005 lisa II
- Artikli 3 lõikes 2 nimetatud uuringud hõlmavad:
- toote füüsikaliste ja keemiliste omaduste erisusi, näiteks pH, veeaktiivsus, soolasisaldus, säilitusainete kontsentratsioon ja pakendi liik, võttes arvesse säilitamis- ja töötlemistingimusi, saastumisvõimalusi ja kõlblikkusaega,
- tutvumist kättesaadava teaduskirjanduse ja uuringuandmetega asjaomaste mikroorganismide kasvu ja ellujäämise tingimuste kohta.
- Vajadusel korraldab toidukäitleja eespool nimetatud uuringute põhjal lisauuringud, mis võivad hõlmata:
- kõnealuse toidu kohta koostatud [matemaatilist prognoosmudelit](#), kasutades asjaomases tootes mikroorganismide kriitilise kasvu või ellujäämise tegureid,
- [\(nakatamis\)katseid](#), et uurida asjaomase inokuleeritud mikroorganismi võimet tootes erinevates põhjendatult eeldatavates ladustamistingimustes kasvada või ellu jääda,
- uuringuid, et hinnata tootes kõlblikkusaja jooksul esineda võivate asjaomaste mikroorganismide kasvu või ellujäämist põhjendatult eeldatavates jaotamis-, ladustamis- ja kasutamistingimustes (**= kestvuskatsed**).
- Eespool nimetatud uuringute tegemisel arvestatakse toote loomulikku muutuvust, kõnealuseid mikroorganisme ning töötlemis- ja ladustamistingimusi.

Toote iseloomustus

- füüsikalis- keemilised omadused mõjutavad mikroorganismide eluvõimet ja kasvu toidus
- andmed toote omaduste kohta on vajalikud
 - ❖ hindamaks, kas toode toetab või ei toeta mikroorganismide kasvu
 - ❖ võrdlemaks andmeid teaduskirjanduses tooduga
 - ❖ säilivuskatsete läbiviimiseks ja tulemuste tõlgendamiseks
 - Nakatamiskatsed
 - Matemaatilised prognoosmudelid

Näiteid mikroorganismide kasvu mõjutavatest teguritest

Sisemised	Välised
pH	Säilitustingimused (tootja kuni tarbija)
veeaktiivsus (a_w)	gaasisegu koostis
soolasisaldus	lõpptoote pakendamistingimused
säilitusained	
mikrobioota	
toidu struktuur	

Nakatamiskatsed- standardid ja juhisdokumendid

Nakkuskatse hõlmab asjaomas(t)e mikroorganismi(de) käitumise jälgimist teadlikult saastatud (kontrollitud tingimustes nakatatud) toidus, et analüüsida kasvupotentsiaali (Δ) (st \log_{10} suurenemist katseperioodil, kui toitu hoitakse kindlaksmääratud säilitamistingimustes ettenähtud ajaperioodil) või hinnata kasvu kineetilisi parameetreid (st mikroobi maksimaalne kasvu kiirus μ_{\max}) konstantsel temperatuuril.

EVS EN ISO 20976-1

Microbiology of the food chain - Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products -- Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate

EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT

on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes*

EURL Lm GUIDANCE DOCUMENT

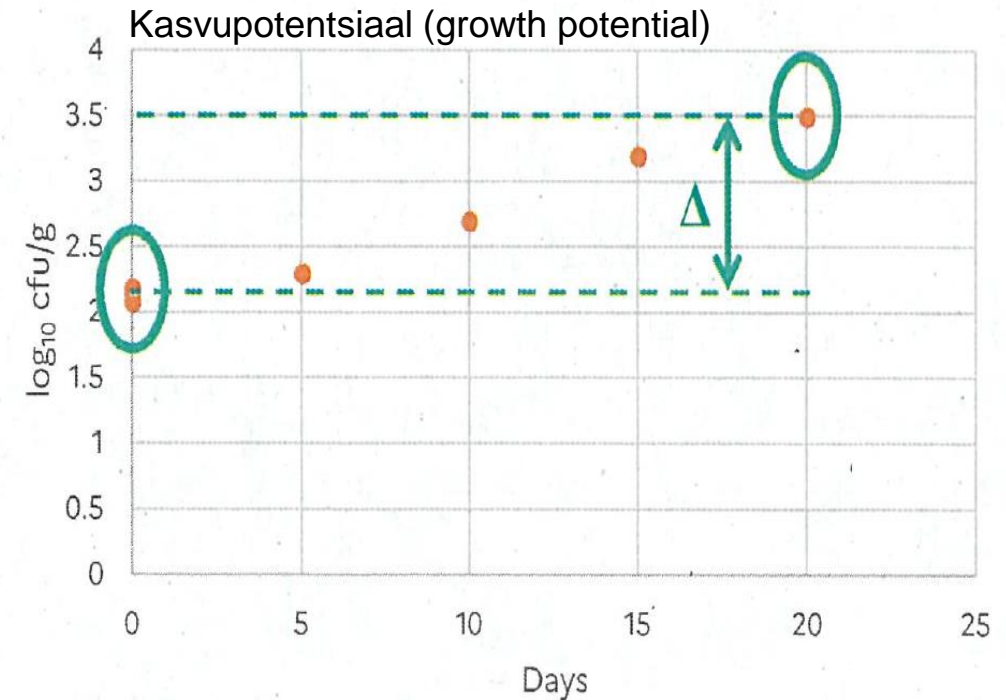
to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods

Nakatamiskatsed – kasvupotentsiaal (Δ)

- Hinnatakse mikroobipopulatsiooni kasvu kindlas tootes
- Toote kunstlik nakatamine 2 mikroobitüve seguga
- Toote inkubeerimine säilitustingimutes (tootja, jaemüük, tarbija)
- Hindamispunkte min 5 ajapunktis

Näiteid kasvupotentsiaali kasutamisest:

- hindamaks, kas toode toetab Lm kasvu või mitte
 - $\Delta \leq 0,5 \log_{10} \text{ cfu/g}$ – ei toeta Lm kasvu (kat 1.3)
 - $\Delta > 0,5 \log_{10} \text{ cfu/g}$ – toetab Lm kasvu (kat 1.2)
- hindamaks Lm arvukust tootmisest tarbimiseni (kat 1.2)
- hindamaks Lm algkontsentratsiooni tootes, et see ei ületaks kõlblikkusaja jooksul lubatud 100 cfu/g piirmäära
 - Lõppkontsentratsioon = algkontsentratsioon + Δ
 - Algkontsentratsioon = lõppkontsentratsioon - Δ



$$\Delta = \log_{10\max} - \log_{10i}$$

kus \log_{10i} on algkontsentratsioon ja $\log_{10\max}$ kõrgeim leitud kontsentratsioon

Nakatamiskatsed – kasvupotentsiaal (Δ)

Plussid

- hea tööriist säilivusaja määramiseks
- lihtne valem Δ väärtuse leidmiseks
- Δ väärtus võimaldab määrata, kas toode toetab mikroorganismi kasvu või mitte
- katseühikute kogus on väiksem, kui maksimaalse kasvukiiruse määramise puhul.

Miinused

- tulemused kehtivad vaid uuringus kasutatud tingimustel. Neid ei saa laiendada teistele tingimustele
- eelnevalt vajalik teada aja-temperatuuri profiili jäljendamaks toidu säilitamistingimusi tootja, jaemüügi ja tarbija tasandil
- kaasaegne inkubaator tagamaks ettenähtud säilitustemperatuurist kinnipidamise

Nakatamiskatsed – kasvupotentsiaal (Δ)

EURL Lm pädevuskatse 2022

Surimi (kalalaadne toode)

3 päeva 4°C; 7 päeva 7°C, 4 päeva 10°C

Kõrgeim kasvupotentsiaali väärtus 3 partii lõikes on 6,62 \log_{10} cfu/g. Kuna väärtus on piirväärtusest 0,5 \log_{10} cfu/g kõrgem, siis on tegu Lm kasvu soodustava tootega.

Kasvupotentsiaali väärtust saab kasutada edasistes arvutustes.

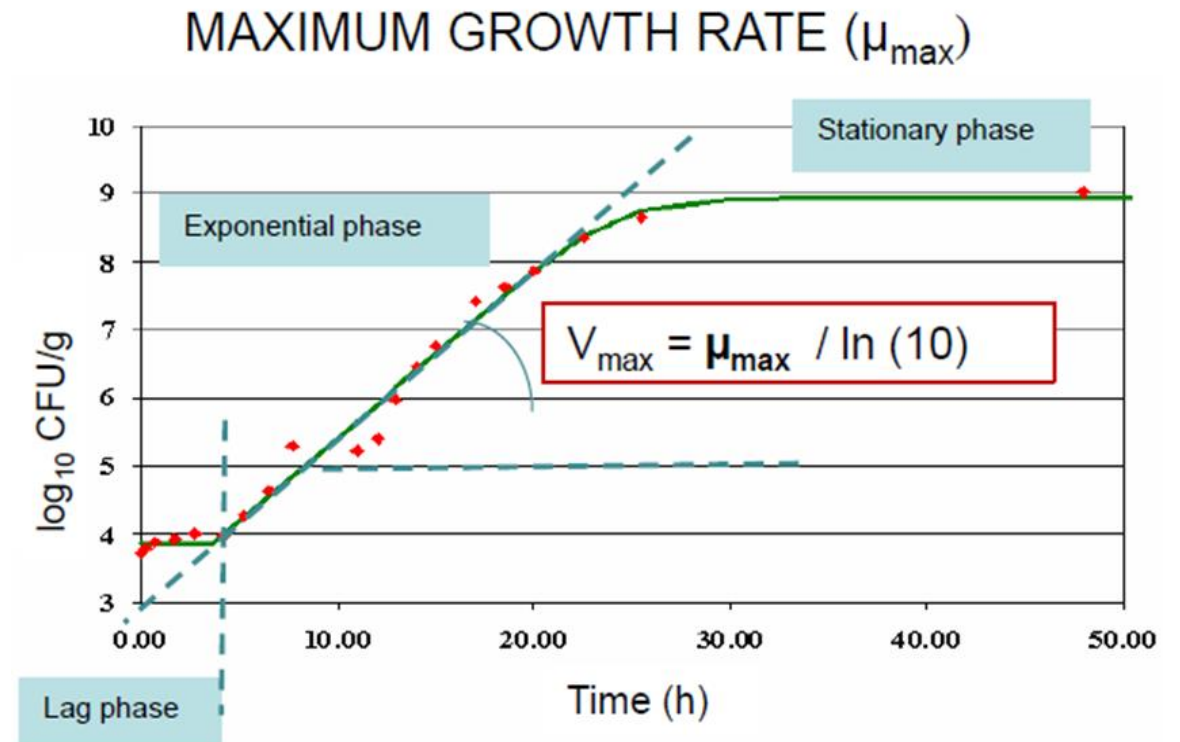
(eelmised 2016, 2018, 2022)

Surim(kalalaadne toode)

Näitaja	Ajapunkt	Partii 1	Partii 2	Partii 3
pH	T0	7,0	7,03	6,99
	T5	7,05	7,05	7,04
a_w	T0	0,97	0,97	0,97
	T5	0,96	0,96	0,96
Lm (\log_{10} ccfu/g)	T0	2,27	2,28	2,29
	T5	8,77	8,75	8,91
Kasvupotentsiaal Δ		6,50	6,47	6,62

Nakatamiskatsed – maksimaalne kasvukiirus (μ_{\max})

- katse mikroobi kasvukiiruse määramiseks tootes
- toote kunstlik nakatamine ühe tüvega
- toote säilitamine püsival temperatuuril
- min 8 ajapunkti
- hindamaks tegurite (temp, pH, aw jt) mõju mikroobi kasvule
- määramaks mikroobi arvukust dünaamilistes keskkonnatingimustes mistahes säilivusaja punktis



Nakatamiskatsed – maksimaalne kasvukiirus (μ_{\max})

Plussid

- võimalik kasutada pikasäilivusajaga toodete puhul
- tulemusi on võimalik laiendada ka teistele tingimustele
- katsed teostatakse vaid ühel muutumatul temperatuuril
- μ_{\max} kasutamine matemaatilistes prognoosmudelites võimaldab hinnata toote saastatuse taset erinevate keskkonnatingimuste juures

Miinused

- vajalikud teadmised ennustavast mikrobioloogiast ja matemaatiliste mudelite kasutamisest
- suurem laborikatsetuste arv (palju ajapunkte) ja sellest sõltuvalt ka katseühikute suurem arv
- mikroobe testitakse individuaalselt
- kui lag-faasi ei arvestata, on oht mikroobikontsentratsiooni ülehindamiseks tootes



Täna tähelepanu eest!

Maiu Kuningas, LABRIS mikrobioloogia osakonna juhataja



LABRIS

Prognoosimudelite kasutamise võimalustest

Kristjan Soo, LABRIS mikrobioloogia osakonna peaspetsialist

Matemaatilised prognoosmudelid/ennustav mikrobioloogia

- Võimaldavad hinnata toote omaduste (nt pH, a_w , soolsus, säilitusained) ja keskkonnatingimuste (nt temperatuur, atmosfäär) mõju bakterite kasvule teatud ajaperioodi vältel
- Lihtne, kasutajasõbralik tarkvara
- Võimalus on kasutada ka ühe tööriistana toidu säilivusaja määramisel
- Reaalsed sisendandmed annavad täpsemaid tulemusi
- Neid saavad kasutada vaid koolitatud inimesed, kes on teadlikud nüüdisaegsetest lähenemistest ning mudelite võimalustest ja piirangutest

Matemaatilised prognoosmudelid/rakendusvõimalused

- Käitlejal
 - tootearenduses
 - tootmisprotsessi kavandamisel, optimiseerimisel
- Toote säilivusaja määramine, võimaldab anda sellele kiire hinnangu
- Käitleja ja pädev asutus saavad hinnata protsesside ja kõrvalekallete mõju
- Laboril abiks nakatamiskatsete planeerimisel (ajapunktid)
- Võimaldab pädevatel asutustel hinnata riske (mikroorganismi arvukust tootes)
- Võimaldab hinnata ka bakterite arvukust, kasvutõenäosust ja mikroorganismi kineetilisi parameetreid

Matemaatilised prognoosmudelid

Esmased mudelid

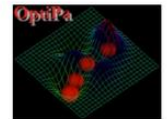
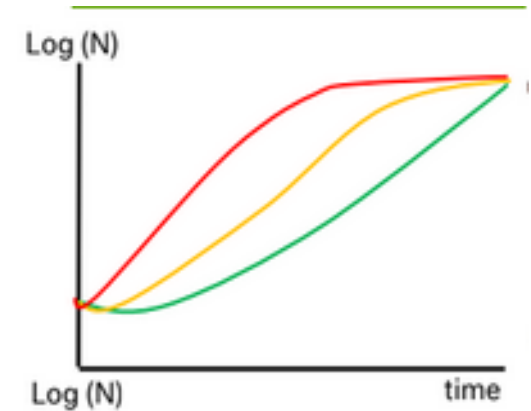
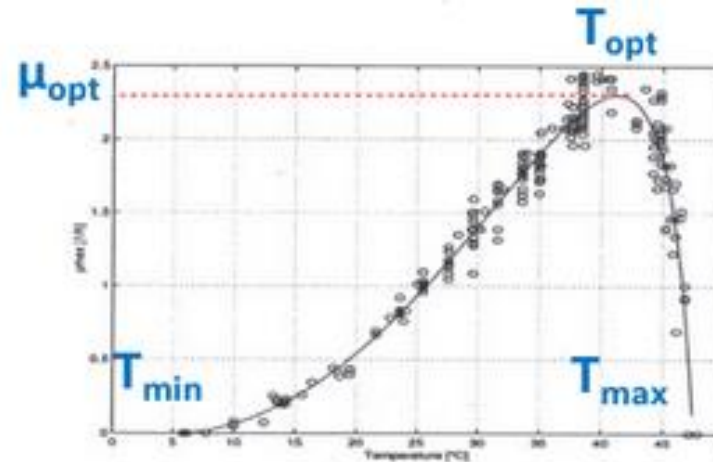
kirjeldavad mikroobse kasvu või inaktivatsiooni kineetikat s.t. mikroobi-populatsiooni sõltuvust ajast.

Teisesed mudelid

kirjeldavad, kuidas füüsikalised-keemilised ja keskkonnatingimused mõjutavad mikroobi kineetilisi näitajaid.

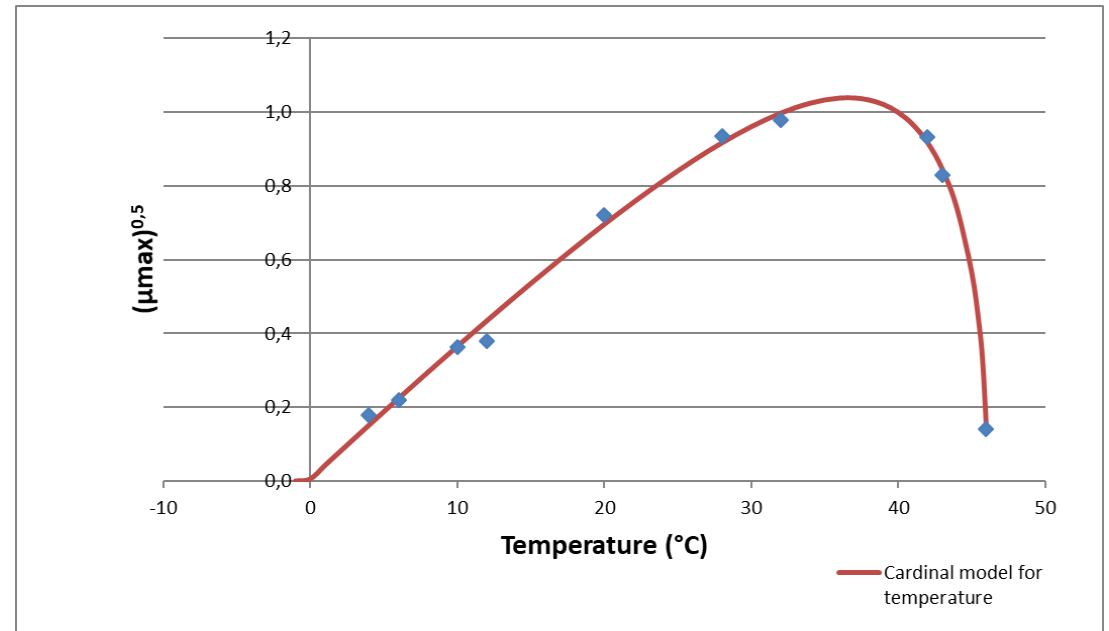
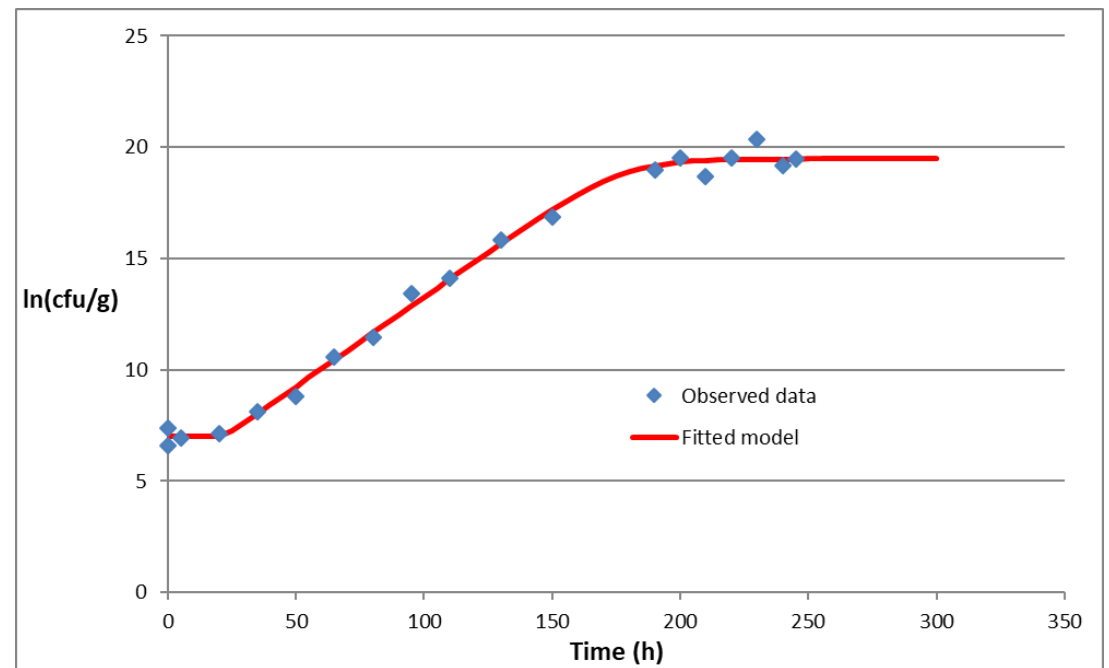
Kolmanda taseme mudelid

ühendavad esmase ja teisese mudeli kasutajasõbralikuks tarkvaraks.



Tarkvara kasutusvõimalused - *Growth curve fitting*

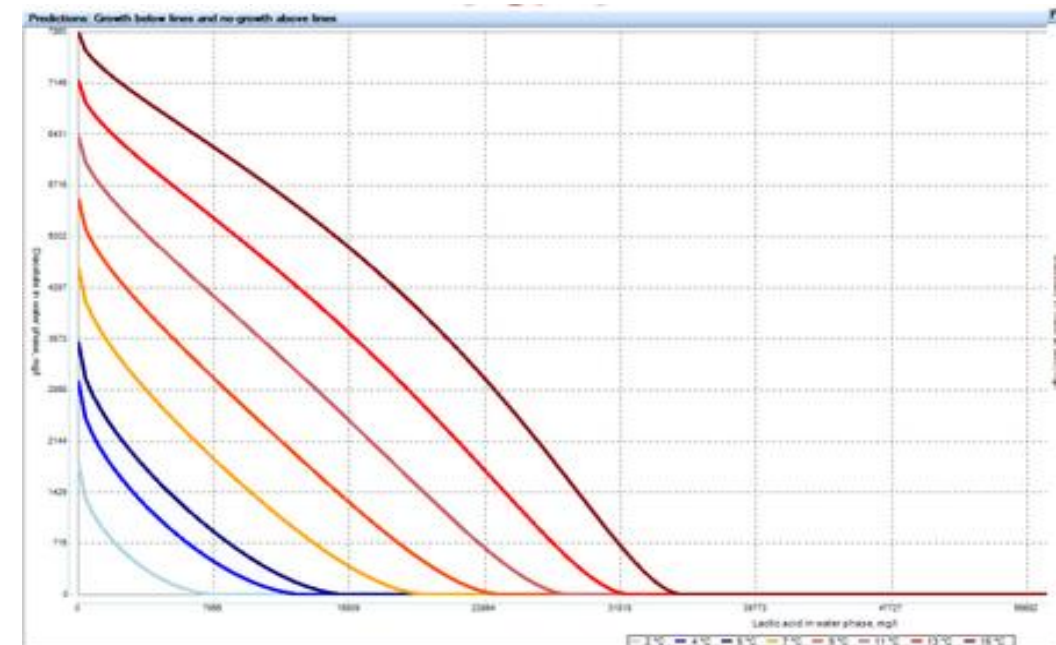
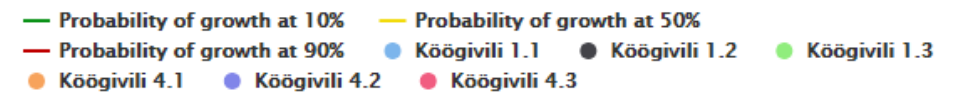
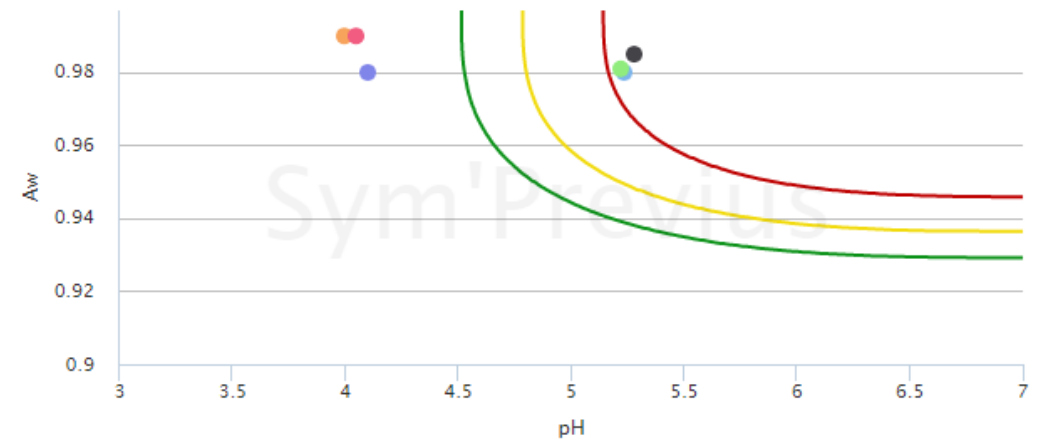
- Nakatamiskatses saadud andmetega on võimalik määrata mikroorganismi kineetilisi parameetrid (alg- ja maksimaalne kontsentratsioon, lag-faas, kasvukiirus).



Tarkvara kasutusvõimalused - *Growth/no growth interface simulation*

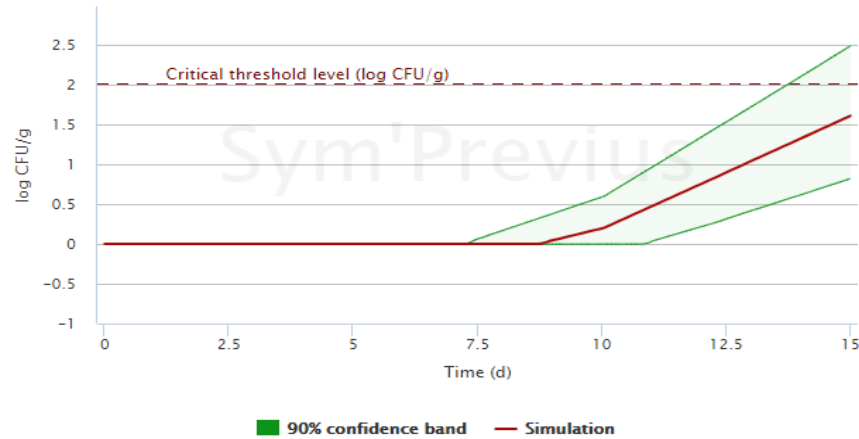
- Mikroorganismi kasvatõenäosus erinevate tegurite suhtes. Näiteks võib olla seos temperatuuri, pH, a_w ja säilitusainete kontsentratsiooni suhtes.
- Kasulik mikroorganismi kasvu mõjutavate füüsikalise-keemiliste ja keskkonnategurite seoste tuvastamiseks.
- Kasvu pidurdamiseks vajalike säilitusainete kontsentratsiooni leidmiseks.

Probability of growth



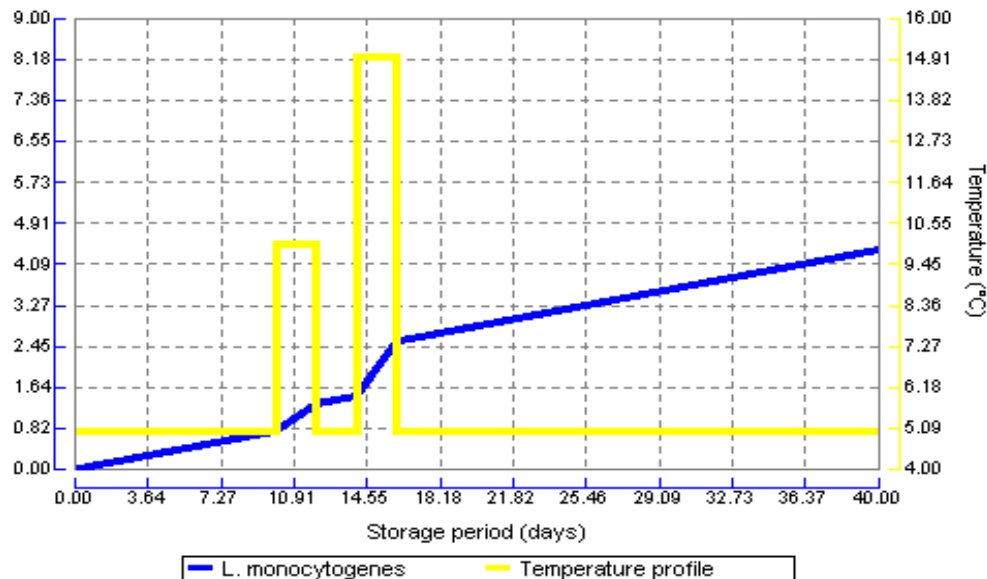
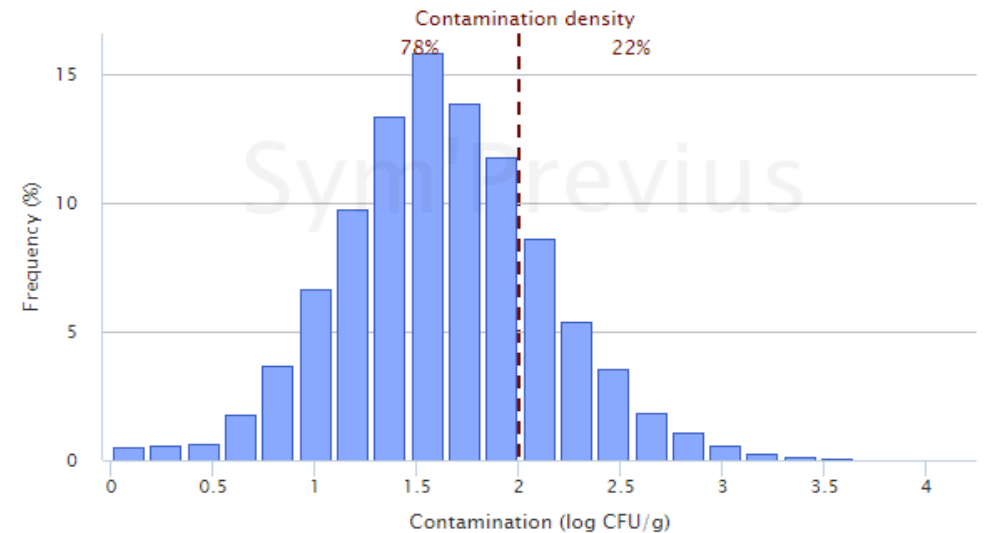


Growth simulation



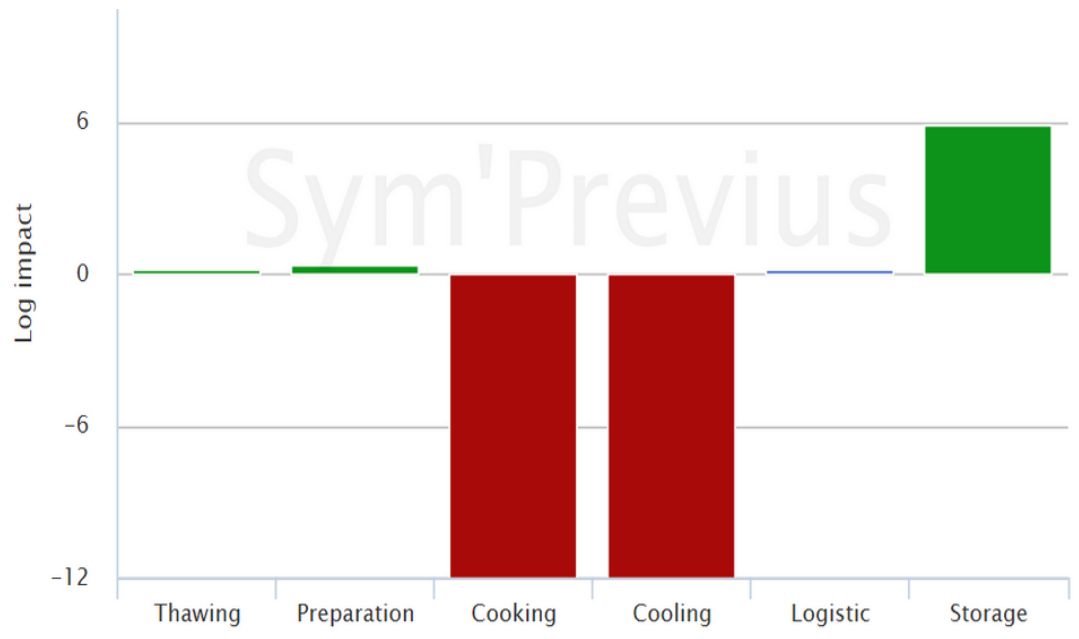
- Simuleeritakse mikroorganismide kasvu
- Aluseks on toote füüsikalised-keemilised omadused ja säilitustingimused.
- Mudelid võivad olla kas deterministlikud või tõenäosuslikud.

Contamination levels at the end of storage

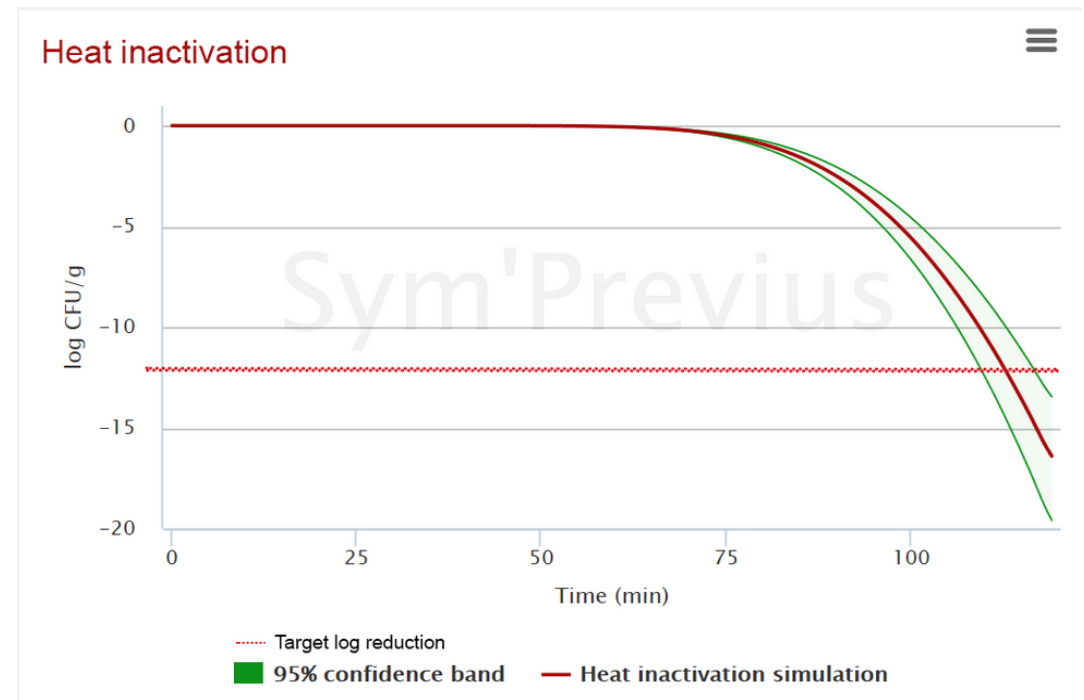


Tarkvara kasutusvõimalused - kasvu simulatsiooni (*heat inactivation*) mudelid

Toidukäitlemise etappide mõju mikroorganismi(de) kasvule



Kuumtöötuse mõju mikroorganismi kasvule



- Symprevius
 - Saab kasutada nakatamiskatsetes, lag-faas, μ_{\max}
 - Tasuline (premium versioon)
 - Palju erinevaid mikroorganisme (25 mikroobide kasvu simuleerimiseks ja 36 inaktivatsiooni mudelite jaoks)
näiteks: *L. monocytogenes*, *L. casei*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus spp*, *Cl. botulinum*, *perfringens*, *sporogenes*, *G. Stearothermophilus*, *S. spp*, *C. sakazakii*, *S. aureus*.
 - Võimalus lisada oma mikroobitüvesid
 - Mudelite salvestamisvõimalus
 - Vähe säilitusaineid



- FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor)
 - Vabavarana kättesaadav
 - Madal mikroobi algkonsentratsioon
 - *L. monocytogenes*, *C. botulinum*, LAB
 - Kuus erinevat säilitusainete gruppi
 - Erinevaid säilitusained ja nende kombinatsioonid
 - LAB ja L.m vastastikuse mõju mudelid
 - Füüsikalised ja keemilised näitajate piirid:
 - Temperatuur (2-25°C),
 - NaCl sisaldus veefaasis (0.7-9.0 %),
 - pH (5.6-7.7),
 - Nitrite sisaldus (0-150 ppm)
 - Bensoaadi sisaldus (1800ppm) veefaasis



Kasutatud allikad

EVS EN ISO 20976-1 Microbiology of the food chain - Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products -- Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate

EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT

on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes* Version 4 of 1 July 2021

EURL Lm GUIDANCE DOCUMENT

to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods Version 3 10/02/2023

Suunised säilimisaja määramise ja sellega seotud toidudatuse teabe kohta, **EFSA Teataja 2020;18(12):6306**

EURL for *Listeria monocytogenes* (2021)- training session on challenge tests

Komisjoni määrus (EÜ) nr 2073/2005, 15. november 2005, toiduainete mikrobioloogiliste kriteeriumide kohta.

EURL training session on predictive microbiology 2022

Täname kuulamast!



Pildi allikas: <https://www.camdenbri.co.uk/blogs/predictive-modelling.php>



Euroopa Maaelu Arengu
Põllumajandusfond:
Euroopa investeringud
maapiirkondadesse