



Novi trendovi uzorkovanja hrane u EU: mlijeko i mliječni proizvodi

Predstavljanje rezultata projekta BASELINE radni paket WP3

BASELINE WP3: Mlijeko i mliječni proizvodi - planovi uzorkovanja i mikrobiološki rizici



Osijek , 19. srpnja 2013

Prof. dr sc . Lidija Kozacinski



Selection and improving of fit-for-purpose Sampling Procedures for specific foods and risks

BASELINE

Opći cilj projekta je osigurati usklađene i potvrđene strategije uzorkovanja, strukturirane prema međunarodnim standardima (npr. ISO), u svrhu potpore europskoj politici u području sigurnosti hrane koji će biti pogodni za proizvođače hrane.

Cilj je takvog pristupa prikupljanje i usporedba podataka, te poboljšavanje kvantitativnih analiza rizika odabranih bioloških i kemijskih agensa.

BASELINE



- 19 institucija
- 9 zemalja
- 9 radnih paketa (WP's)



BASELINE

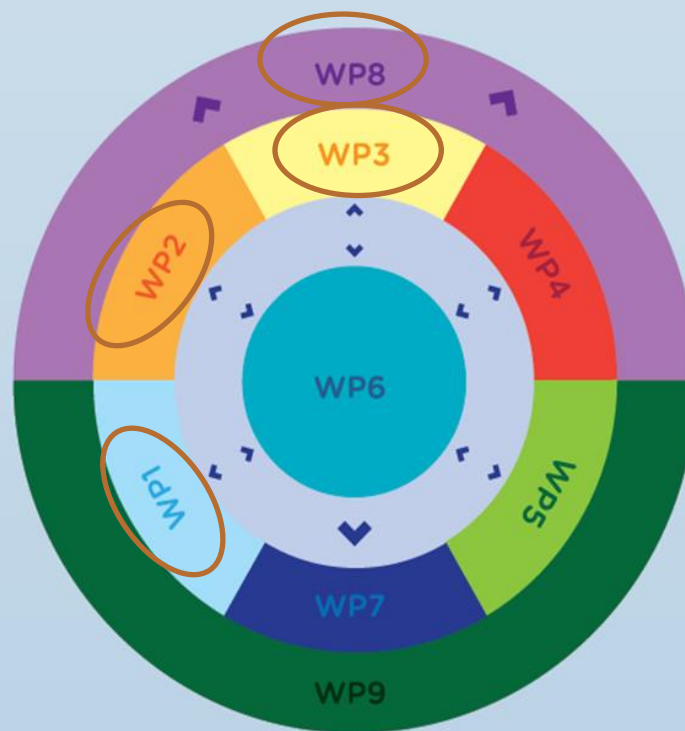


- HR tim – 4 WP
- Hrana:
 - a) Riba i riblji proizvodi
 - b) Jaja
 - c) **Mlijeko i mliječni proizvodi**

Ostale aktivnosti –

- d) diseminacija

Workpackages



BASELINE



- Ciljevi WP:
 - A. Pregled planova uzorkovanja za odabrane proizvode
 - B. Identificirati faktore rizika i njihove PO i FSO u odabranim proizvodima
 - C. Procijeniti potrebu za novim ili prilagođenim analitičkim metodama kako bi se osigurala sigurnost odabranog proizvoda

Workpackages



Svrha upravljanja rizikom – postaviti **ciljeve sigurnosti hrane**
(prikladne/prihvatljive)

ALOP = Appropriate Level of Protection of Public Health – *prihvatljiva razina
za zaštitu zdravlja*

FSO = Food Safety Objectives – *kriteriji sigurnosti hrane*

PO = Performance objectives – *kriterij procesne faze*

PC = Process criteria – *procesni kriteriji*

Osvrt na ciljeve WP3



A) Pregled planova uzorkovanje za odabrane proizvode

Task 3.1: Odabrati proizvod i proizvodni proces.

Task 3.2: Pregled planova uzorkovanja za svaku odabranu kategoriju proizvoda

B) Identificirati faktore rizika i njihove PO i FSO u mlijeku i odabranim mliječnim proizvodima

Task 3.3: Identificirati faktore rizika njihove PO i FSO vrijednosti za različite kategorije mlijeka i mliječnih proizvoda i različitim europskim zemljama

Subtask 3.3.1. *Biološki rizici*

Subtask 3.3.2 *Kemijski rizici*

Subtask 3.3.3 *Transport i pohrana kao izvor promjenjivosti bioloških opasnosti*

C) Procijeniti potrebu za novim ili prilagođenim analitičkim metodama kako bi se osigurala sigurnost mlijeka i mliječnih proizvoda

Task 3.4. Procijeniti potrebu za novim/prilagođeni analitičkim metodama



	Proizvod	Biološki rizici	Partneri	Kemijski rizici	Partneri
WP3	Svježe sirovo mlijeko	<i>Listeria monocytogenes</i>	TEAGASC UNIBO	Dioxin	UBO
		VTEC	TEAGASC UNIBO	Aflatoxin M1	UNIBO UBO
		<i>Salmonella</i>	UCPH	PCBs	UNIBO
	Sir (nepasterizirano kravlje mlijeko)	VTEC uključujući <i>E. coli</i> O157:H7	TEAGASC UNIBO		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	TEAGASC UNIBO UCPH VETFAC		
	Sir (nepasterizirano ovčje mlijeko)	<i>Listeria monocytogenes</i>	ITACyL		
		<i>Salmonella</i>	ITACyL		
	Polutvrđi i tvrdi sirevi (pasterizirano kravlje mlijeko)	<i>Listeria monocytogenes</i>	VETFAC ITACyL TEAGASC UNIBO		

Planovi uzorkovanja

EU

- službena tijela
- proizvođači hrane
- Nacionalno zakonodavstvo



<http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>

Zemlja	Zakon/pravilnik	Mjesto uzorkovanja	Broj uzoraka	Učestalost uzorkovanja	Vrsta uzorka
Njemačka	Reg EC 2073/2005 (1441/2007). Nacionalni propisi	Službeno uzorkovanje u odabranim objektima Uzorkovanje proizvoda u maloprodaji	$n=5$; $c=0$ or $n=5$; $c \leq 100$ cfu/g;	Određena planom (rotacija, jednom mjesečno)	Nepasterizirani sirevi, sirovo mlijeko
Irska	Reg EC 2073/2005 (1441/2007). Nacionalni propisi	Službeno uzorkovanje u odabranim objektima Uzorkovanje proizvoda u maloprodaji	$n=5$; $c=0$ or $n=5$; $c \leq 100$ cfu/g;	Određena planom (rotacija, jednom mjesečno)	Sir, cijeli proizvod
Španjolska	EU regulation 2073/2005 modified by EU regulation CE 1441/2007	Finalni proizvod, površina	5	Ovisno o količini proizvoda	Sir
Hrvatska	Nacionalni propis kompatibilan s EU regulation EC 2073/2005	Nakon proizvodnje	5	Ovisno o količini proizvoda	Sir
Italija	Regulation (EC) N. 1441/2007	Samokontrola – na kraju proizvodnje Službeno uzorkovanje u odabranim objektima Uzorkovanje proizvoda u maloprodaji	$n=5$; $c=0$; $m=$ odsutnost u 25g at production/ $m < 100$ CFU/g u proizvodima na tržištu tijekom roka održivosti	Samokontrola – rotacija; jednom mjesečno ovisno o proizvodnji Uzorkovanje samo RTE proizvoda kada SPH ne može dokazati da može provesti učinkovite mjere kojima će listerija biti uništena ili kada može rasti nakon primijenjenih postupaka obrade Nationalni/regionalni godišnji planovi uzorkovanja	Mliječni proizvodi



Zemlja	MO	Zakon/pravilnik	Mjesto uzorkovanja	Broj uzoraka	Učestalost uzorkovanja	Vrsta uzoraka
Italy	<i>Listeria monocytogenes</i> VTEC (O157 i non-O157) <i>Salmonella</i>	Sporazum između talijanske vlade i regionalnih tijela od 25/01/07. Specifications** on the frequency of controls in local (regional) provisions such as: decision Giunta Regionale Emilia Romagna n. 4418 del 21/4/2008 e Giunta Regione Veneto n. 2950 del 10/11/2005	Na farmi - samokontrola Na mljekomatima - službene kontrole	Odsutnost <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> i <i>Escherichia coli</i> O157* (VTEC serotipovi O26, O103, O111 i O145, u 25 ml skupnog uzorka mlijeka	Samokontrola – mjesečno Nakon 3/6 neg rezultata učestalost se smanjuje (odobrenje službenih veterinarara) na 1 uzorak svaka tri mjeseca Službene kontrole svakih 6 mjeseci s barem jednim uzorkovanjem tijekom ljetnih mjeseci	Skupni uzorak mlijeka, 1L nakon miješanja

Laboratorijske metode:
ISO metode

“Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food“

Uzorkovanje - bakterija *Listeria monocytogenes* u mlijeku i proizvodima



Zašto?

- Rezultati istraživanja sirovog mlijeka:
 - očekivano 3–4% uzoraka sadrži listerije
- Istraživanja pokazuju malu koncentraciju bakterije (<10 cfu/ml).
- Pasterizacija uništava listeriju – prisutnost patogena u finalnom proizvodu – naknadna kontaminacija – okoliš proizvodnog pogona
- Mnogi čimbenici vezani uz svojstva proizvoda i način proizvodnje utječu na sposobnost bakterije da preživi i razmnožava se
- Prevalencija uvijek mala

- Portugal – službeni izvještaj o 6,0% pozitivnih nalaza *L. monocytogenes* u broju > 100 cfu/g (n=265) – skupni uzorci mlijeka / 98 farmi
- Izvještaji – nalaz *L. monocytogenes* - uzorci sira (2,35%). Prevalencija *Listeria* spp. u bijelim sirevima 8,23% *L. monocytogenes* potvrđena u samo – 2,35%
- 112 uzoraka svježeg i kiselog mlijeka, kiselog vrhnja, mekog, kuhanog i tvrdog sira - *Listeria* spp utvrđena u 20,53% uzoraka - *L. monocytogenes* 13,39% uzoraka svježeg i kiselog mlijeka, mekog sira – nalaz negativan u kuhanom i polutvrdom siru iz domaće proizvodnje
- Itd....



- Listerija i dalje evidentirani uzročnik oboljenja ljudi !

Uzorkovanje – službena tijela/kontrole

- Primjena Reg EC 2073/2005 (1441/2007)
- Irska – nema službenih planova uzorkovanja
- Analitičke metode – detekcija ISO 6579:2002.

mljeko

Uzorkovanje - SPH

- U većini zemalja proizvođači imaju svoje vlastite postupke i planove uzorkovanja (HACCP, GMP, GHP).
- Ukoliko je potrebna pretraga na listerije – službene analitičke metode propisane EC regulation 2073/2005 (1441/2007).
- Analitička metoda ISO 6579:2002.

Uzorkovanje – službene kontrole

- Metode uzorkovanja variraju
- Službeni postupci uzorkovanja na snazi
- Irska – uzorkovanje sireva u maloprodaji; Španjolska nakon proizvodnje .
Uzorak – cijeli sir ili min 500 g
- Učestalost uzorkovanja ovisi o proizvodnji ili je najčešće propisano jednom mjesečno

sirevi

Uzorkovanje SPH

- Španjolska i Irska – uzorci tijekom proizvodnje (površina proizvoda, tvrdi sirevi i finalni proizvod)
- Analitičke metode - ISO metode 1120:1996.
- Proizvođači – samokontrola - 500g sira, proizvodnja HRN ISO 10560:2001

NOVI ZAKON O HRANI

(Uredba (EZ) br. 178/2002)



HRANA

ZAKON O HIGIJENI HRANE

Uredba (EZ) br. 852/2004 – opća pravila
higijene hrane

Uredba (EZ) br. 2073/2005 – mikrobiološki
kriteriji za hranu

ZAKON O SLUŽBENIM KONTROLAMA

Uredba (EZ) br. 882/2004 – opća pravila
službenih kontrola

HRANA ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA

ZAKON O VETERINARSTVU

Uredba (EZ) br. 853/2004 - posebna
pravila - higijena hrane životinjskog
podrijetla

Uredba (EZ) br. 854/2004 - službene
kontrole proizvoda životinjskog podrijetla

ZAKON O INFORMIRANJU POTROŠAČA O HRANI

Uredba (EU) br. 1169/2011

Aktivnosti:



- Aktivnost 1: Istraživanje **prevalencije *L. monocytogenes*** u pasteriziranom i nepasteriziranom ovčjem siru o polutvrdom siru iz pasteriziranog kravljeg mlijeka
+ inicijativa za **okvirni model** kako bi se modelirala prevalencija *L. monocytogenes* u svakoj fazi proizvodnje sira
Nove analitičke metode za identifikaciju rizika povezanog s mliječnim proizvodima
L. monocytogenes (Protocol Rodriguez et al., 2004; Itacyl and Teagasc – validacija metode; ISO 11290-1:1996/ISO 11290-2:1998 vs RT-PCR)
- Aktivnost 2: Istraživanje prevalencije *Salmonella* spp u pasteriziranim i nepasteriziranim ovčjim sirevima -
Nove analitičke metode za identifikaciju rizika povezanog s mliječnim proizvodima
Quantification of *Salmonella* (Dublin/spp.) in raw milk by qPCR.
comparison between qPCR and MPN count (validation with artificially inoculated raw milk samples)
- Aktivnost 3: Istraživanje prevalencije verotoksične *Escherichia coli* u sirovom mlijeku (prema EFSA, 2009) i istraživanje preživljavanja VTEC tijekom proizvodnje mozzarelle
+ inaktivacija VTEC
Nove analitičke metode za identifikaciju rizika povezanog s mliječnim proizvodima
Osjetljivost prema akriflavinu – detekcija VTEC u sirovom mlijeku (EFSA)
Količina VTEC u sirovom mlijeku - qPCR: eksperimenti sa sojevima O157
Usporedba qPCR i MPN
- Activity 4: Procjena **transporta i pohrane** kao uzroka promjenjivosti bioloških opasnosti
 - Uspostaviti **kriterij procesne faze (PO) - inicijalni dan pohrane** (ready-to-sale)
 - **Predvidjeti rast *L. monocytogenes*** tijekom perioda pohrane od xy dana

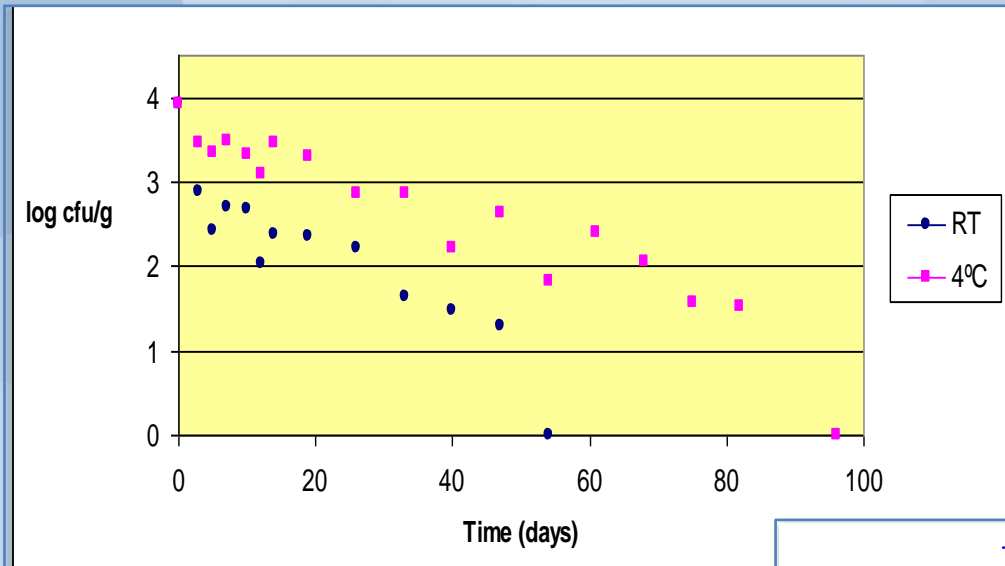
Listeria monocytogenes - prevalencija



- Istraživanja - prevalencija *L. monocytogenes*:
 - svježi, polutvrđi i tvrdi sirevi od kravljeg mlijeka
 - pasterizirani i nepasterizirani sirevi od ovčjeg mlijeka
 - ➔ prevalencija listerije u sirevima je veoma niska
- **pasterizirani i nepasterizirani ovčji sirevi** (250 g vakuum pakiranje) – uzorkovani u sirani
 - ISO metode (ISO 11290-1:1996 – detekcija i ISO 11920-2:1998 brojanje).
 - uzorkovanje – 10 puta, 5 uzoraka iz istog lota
 - **rezultat:** 2 pozitivna nalaza / 400 uzoraka
- **polutvrđi sir iz pasteriziranog ovčjeg mlijeka**
 - 250 g uzorka iz različitih proizvodnih faza
 - **rezultat:** 0 / 150 uzoraka
- **svježi kravljji sir iz nepasteriziranog kravljeg mlijeka**
 - **rezultat:** 1 pozitivan nalaz / 360 uzoraka
- **kuhani sir iz nepasteriziranog kravljeg mlijeka**
 - **rezultat:** 0 / 30 uzoraka
- Dodatni literaturni podaci – izrada modela

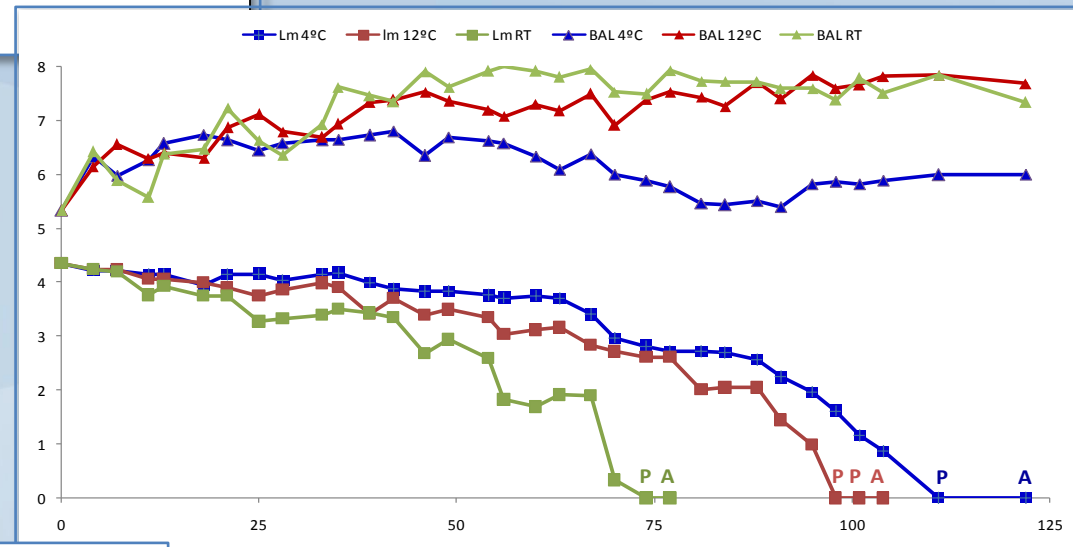
ItaCyl
TEAGASC
UNIBO
VETFAC

Listeria monocytogenes - rast



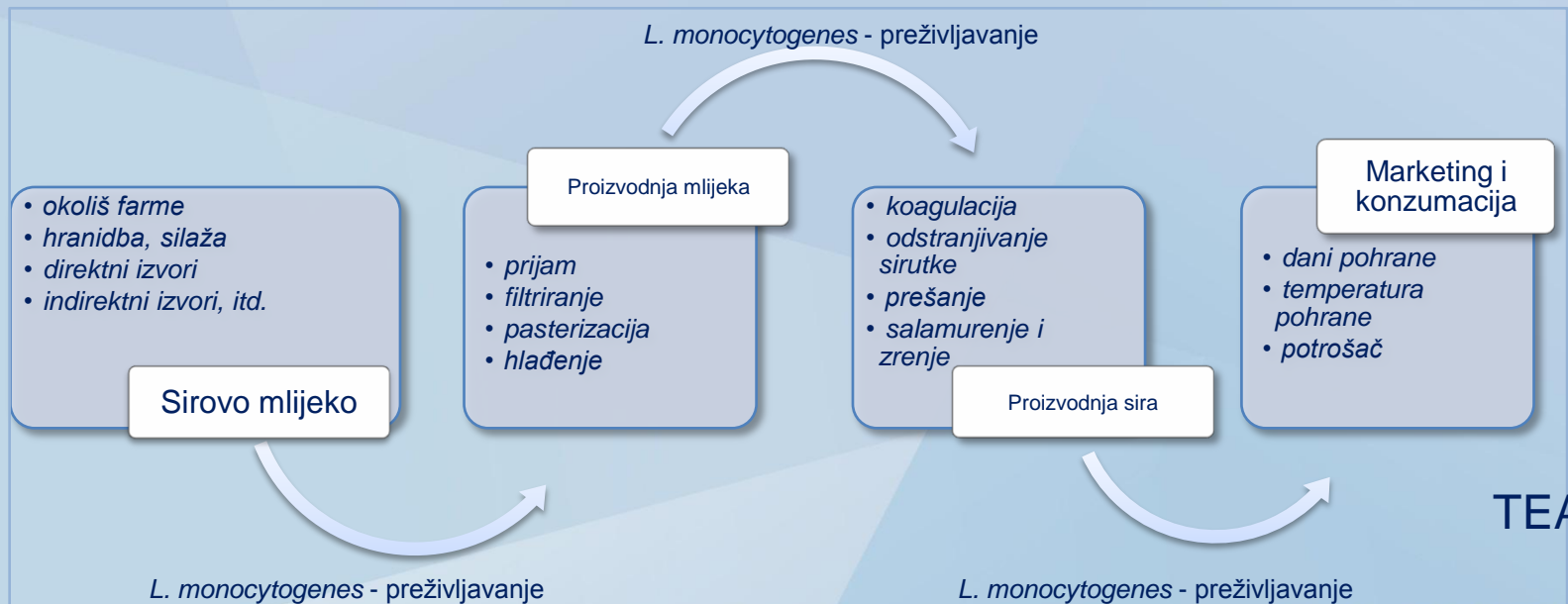
- ITACYL
- Tvrđi ovčji sir

Bakterije
mliječne kiseline



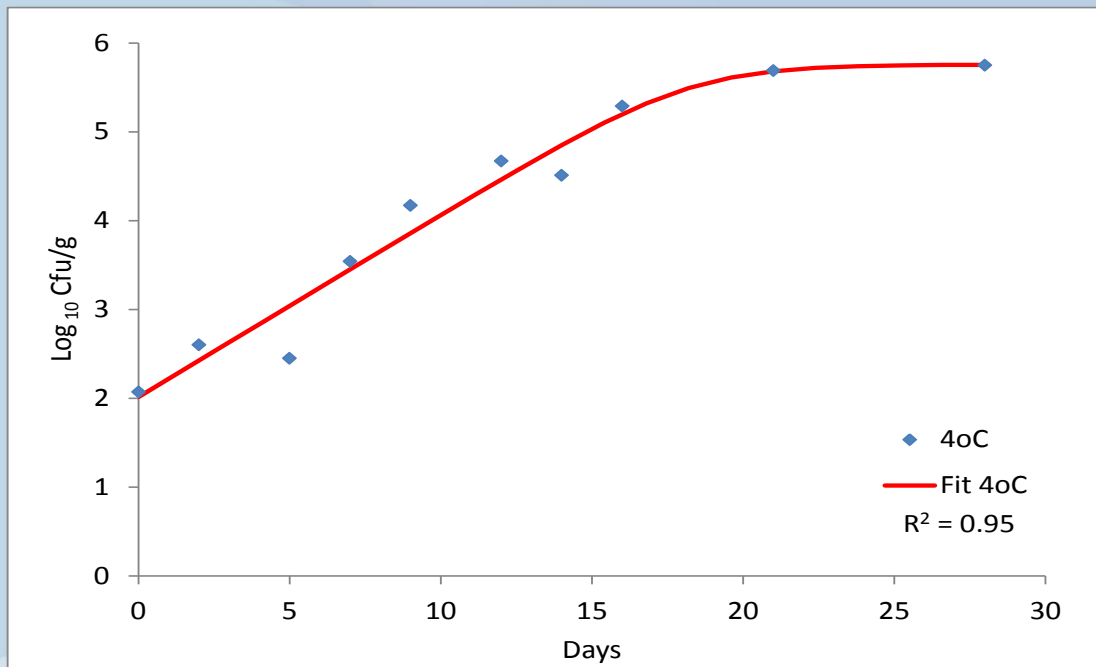
P: Presence but below the limit of quantification;
 A: absence no detection of *L. monocytogenes* was observed
 - for samples stored at RT - day 77, 12°C – day 104, 4°C - day 122

- Literaturni podaci – identificirati **kritične faktore** koji utječu na rast *L. monocytogenes* tijekom proizvodnje sira
- Pojava *L. monocytogenes* - sporadičnost
- Faktori koji utječu na kontaminaciju sira:



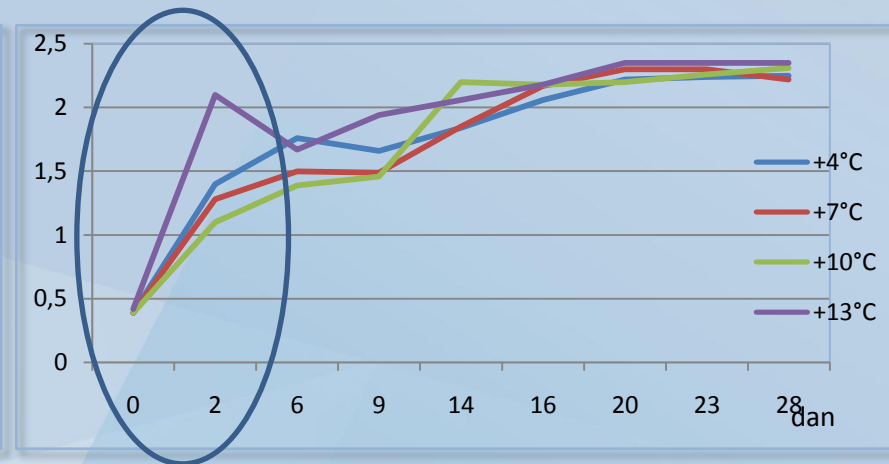
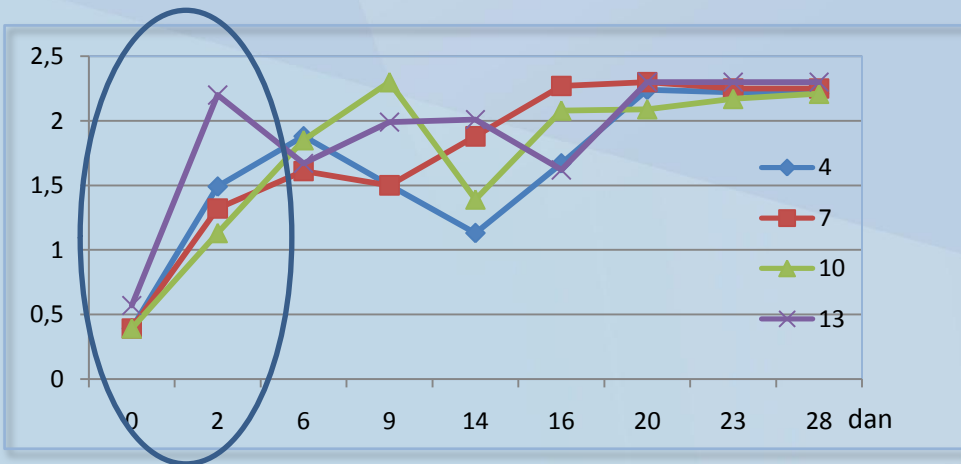
TEAGASC

- Inokulacija površine sira (meki sirevi)
- Barayani growth model DMfit (www.ifr.ac.uk)
- Modeli predviđanja rasta *L. monocytogenes* pokazuju dobru korelaciju ($R^2= 0.95$) za 4°C, ($R^2= 0.99$) za 10°C i ($R^2= 0.96$) za 15°C.
- Aw opadanje – pH povećanje – prikladni uvjeti za preživljavanje



Pohrana na 4 °C i 10 °C - rast listerije u siru od pasteriziranog mlijeka ali ne u siru od nepasteriziranog mlijeka

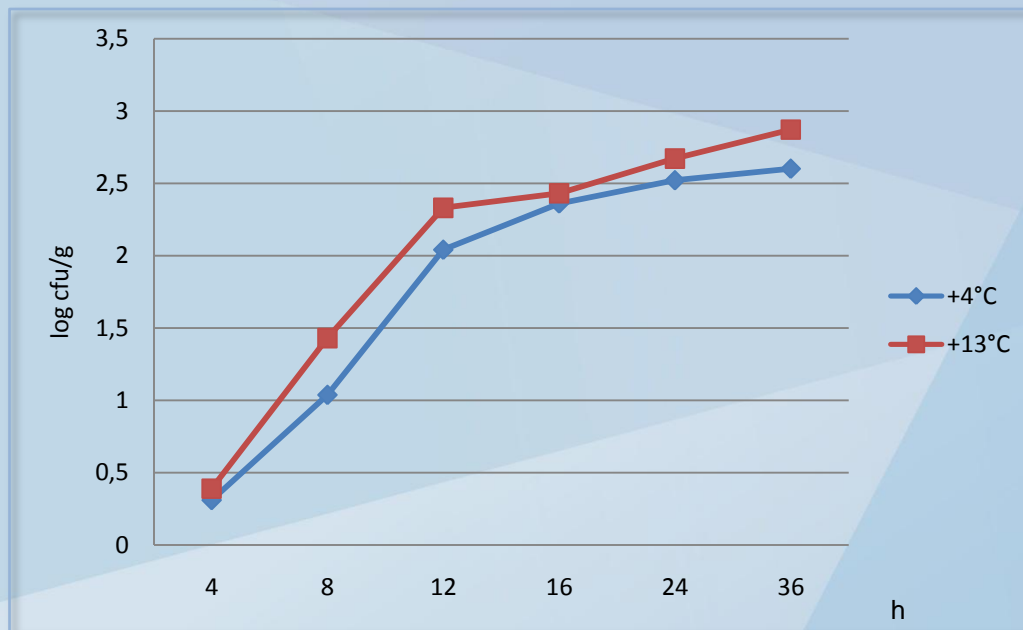
- Kuhani sirevi – inokulacija s *L. monocytogenes* - 10^4 cfu/ml
 - inkubacija 28 dana na odabranim temperaturama
 - pH, aw
- **rezultat:** nagli rast u prva dva dana i blagi porast do 2,4 log cfu/cm² (max broj nakon 28 dana).



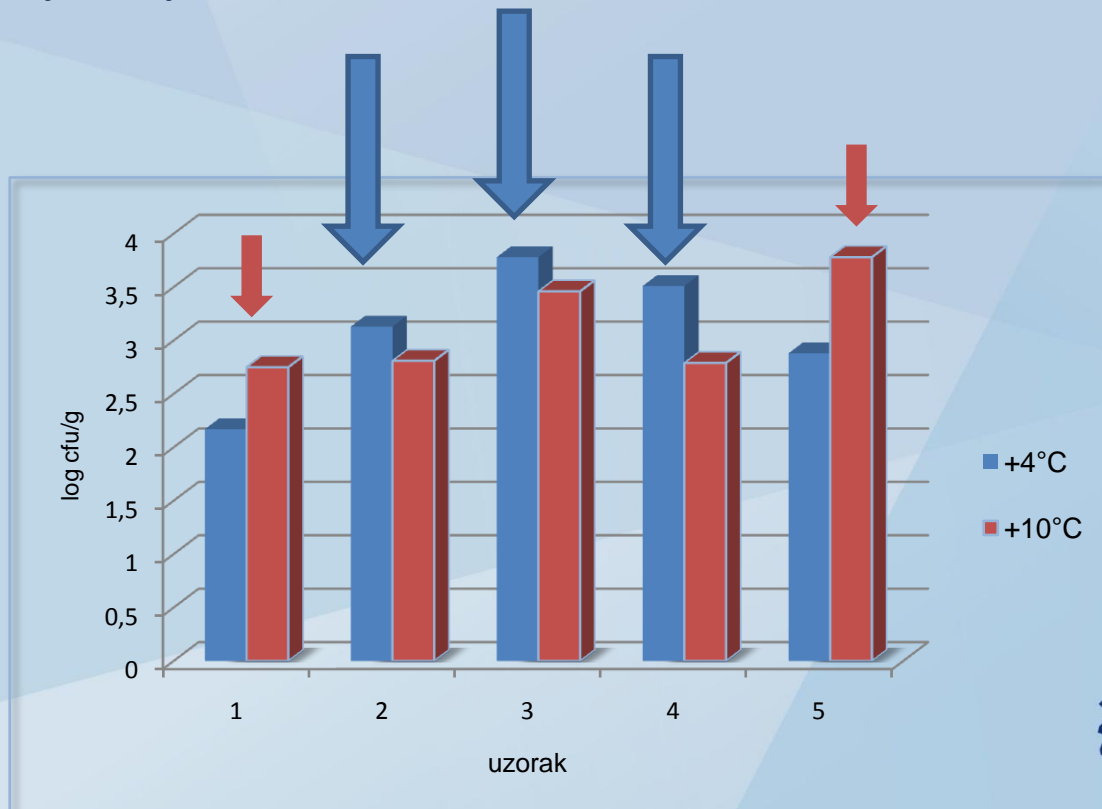
- nema značajne razlike u koncentraciji na različitim temperaturama
- **dodatni eksperiment (1-2 dana) da se popune praznine (više analitičkih točaka)**
- **prediktivni model.**
- **prikladnost modela** - odvija li se lag faza u prva dva dana

“36 h eksperiment”

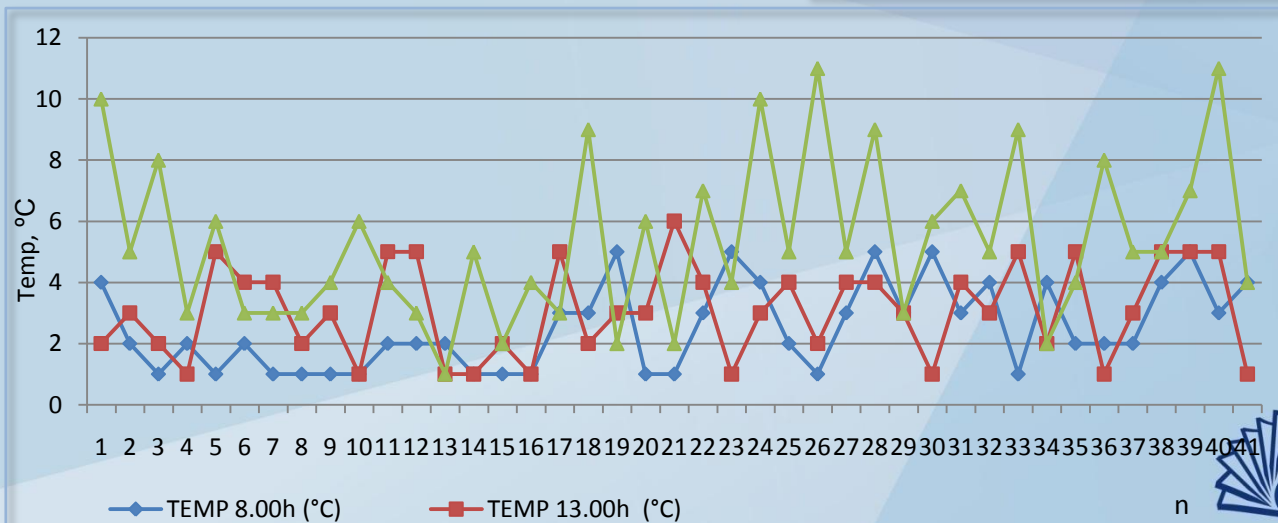
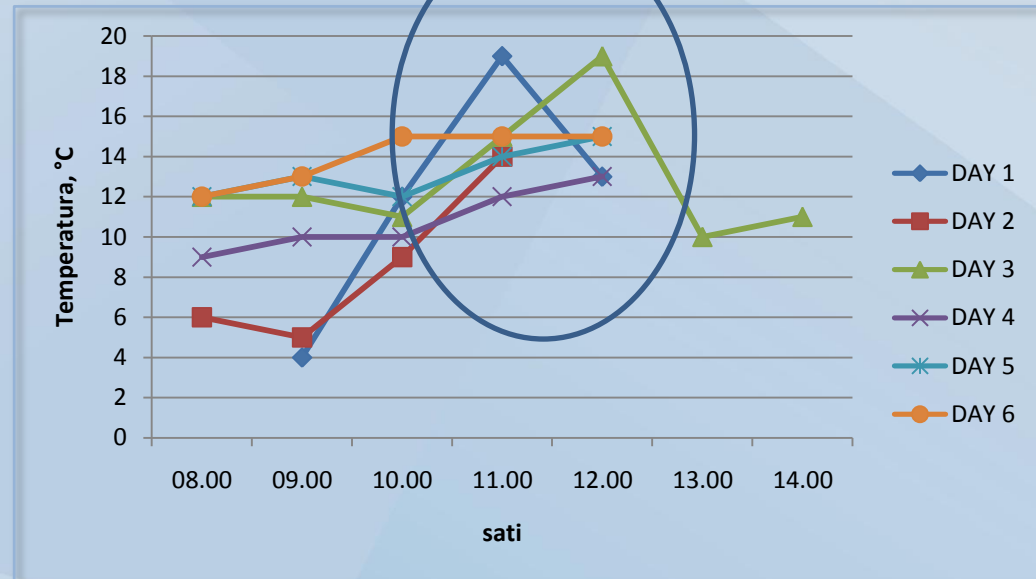
- Uzorci (30g) kuhanog sira onečišćeni s 10^4 cfu/mL bakterije *L. monocytogenes*
- Pohrana na 4°C i na 13°C
- Rast *L. monocytogenes* – svaka 4h
- **Rezultat:** Izrazit rast primijećen je tijekom prvih 12 h nakon inokulacije
 - najveće vrijednosti oko 3 log nakon 36 h
- nije bilo značajnije razlike rasta na različitim temperaturama



- Svježi kravliji sir- uzorkovan u mljekari
- Temperature: 4°C i 10°C.
- Uzorkovanje sira
 - inokulacija s *L. monocytogenes*
 - uzorkovanje 1. i 7. dan – broj *L. monocytogenes*
- Kroz 7 dana pohrane broj patogena bio je ispod inokulirane vrijednosti (10^4 cfu/mL)
- Broj listerija 7. dan



- Podaci vrijeme / temperatura od otpreme do maloprodaje - **stabilna**
- Temperature u maloprodaji – lokalne tržnice u Zagrebu - **nestabilna**



- **Uzorkovanje - mikrobiološki rizici** - prema EU Reg. 2073/2005
- ISO metode
- Prevalencija patogena (= razina kontaminacije tvrdih sireva) je **niska** potrebno je **opsežno uzorkovanje (veći broj uzoraka)**
- **Plan uzorkovanja ovisi o tri glavna čimbenika:**
 - Broj lotova (proizvodne šarže) koje treba testirati kroz određeno vremensko razdoblje;
 - Broj uzoraka koje treba testirati u svakom lotu;
 - Količina uzorka.
- Plan uzorkovanja - trenutno ne postoje posebni planovi uspostavljeni na razini EU i broj uzoraka po lotu definira se kao 5 u 25 g uzorka.
- Učestalost uzorkovanja – ne može se odrediti unaprijed – osnova testovi na prisutnost/odsutnost patogena u konačnom proizvodu
- Metode – ISO
- Alternativne metode?

Tvrđi (ovčji) sir / *Listeria monocytogenes*



- Plan uzorkovanja: prema rezultatima unutar BASELINE-a, FSO i promjena planova uzorkovanja - **nije praktična u tvrdim sirevima**



1. Očekivana prevalencija u lotu je **preniska**
– analitičke metode (ISO) – limit detekcije ?
 2. Planovi uzorkovanja zahtijevaju **veliki broj uzoraka** u lotu da bi se razlučili pozitivni od negativnih (npr. 42 uzorka - nije realno moguće);
 3. **GMP** u pogonu - finalni proizvod može biti **Listeria free** (a_w i pH su niski, mikroorganizmi koji inhibiraju *L. monocytogenes* tijekom pohrane)
- **tvrdi sirevi = ready-to-eat proizvodi**
- ako se uspostavi FSO=2 log cfu/g, potrebna je izrazito visoka kontaminacija nakon proizvodnje da bio konzumacija sira dovela do listerioze!
 - Strategija uzorkovanja korisna je u slučajevima **naknadne kontaminacije ili ponovne kontaminacije** – prevalencija i koncentracija patogena na radnim površinama...

PRIJEDLOG:

Baseline rezultati – veličina uzorka za analizu –
50 g umjesto 25 g povećava mogućnost detekcije patogena

Kuhani sir / *Listeria monocytogenes*

- **PO** – maksimalna koncentracija patogena - FSO = 2 log cfu/g
održivost 28 dana
- Različiti scenariji pohrane

15 dana na + 4°C i 13 dana na +12°C

PO = 1 cfu/10g \longrightarrow 5 uzoraka á 10 g ~~25 g~~

15 dana na +8°C i 13 dana na +12°C

PO = 5 cfu/20g \longrightarrow 4 uzorka á 20 g ~~25 g~~

- Pohrana na visokim temperaturama – manja kontaminacija – isti FSO -
100 cfu/g

Mikrobiološki kriteriji za hranu (EC No 2073/2005) *L. monocytogenes* u ready to eat hrani

- **M=100 cfu/g; n=5; c=0** - na kraju proizvodnje SPH garantira limit 100 cfu/g tijekom roka održivosti

ili:

- **M= 0/25g; n=5; c=0** SPH ne garantira da limit neće biti prekoračen

U oba slučaja PO = < 100 CFU/g

TRADICIONALNE METODE - ISO		NOVE/ALTERNATIVNE METODE RT-PCR	
<i>Listeria monocytogenes</i>			
Slabosti	Prednosti	Slabosti	Prednosti
> 5 dana do rezultata	Referentna metoda	Nije referentna metoda	Brza (1 dan do rezultata)
Potrebno mnogo vremena		Teško se prihvaća u industriji (možda kao screening metoda)	Visoko specifična i osjetljiva
Skupa metoda (bujoni, podloge, biokemijska potvrda)		Različite jedinice -trenutno EU zakonodavstvo – cfu	Iako nije jeftina, cijena reagensa je približna cijeni standardne metode

PO u proizvodnji sireva – tvrdi - polutvrđi

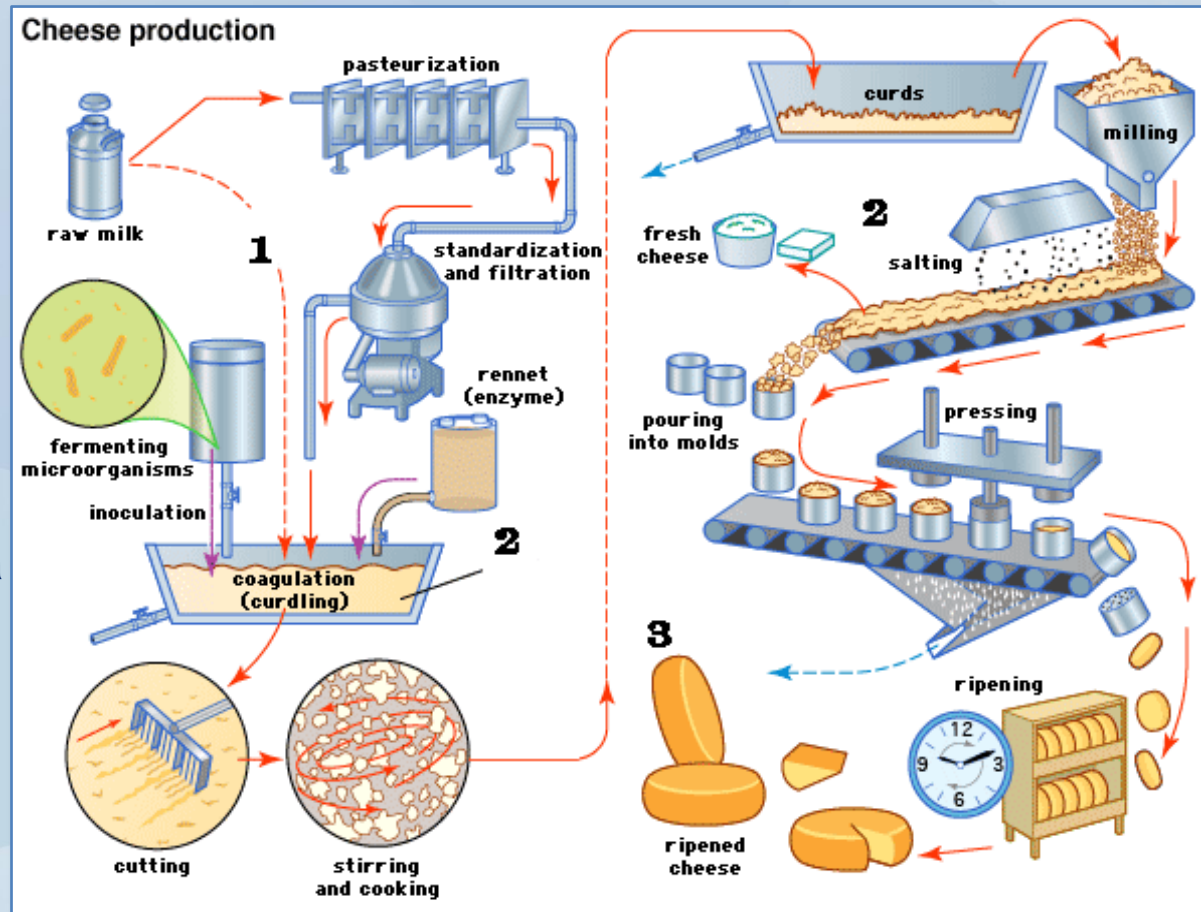
1. PO sirovo mlijeko – tradicionalni sirevi

L. monocytogenes 0/25 g
- Prevalencija u okolišu i sirovom mlijeku

2. PO uvjeti vrijeme / temperatura

L. monocytogenes 0/25 g
- uzorkovanje u okolišu umjesto proizvoda radi pravovremenog upozorenja o rizicima (brisovi)
- prediktivni modeli: rast LM u siru

3. FSO finalni proizvod maloprodaja



Proizvod	FSO	PO koji slijedi FSO	Uzorkovanje i pojašnjenje PO
Sirovo mlijeko	Aflatoxin M1 *	40 ng/kg u 1 uzorku	Izrađen model koji definira učestalost uzorkovanja na osnovi podataka sakupljenih u Italiji od 2003 do 2010
Sirovo mlijeko	PCB's		Za PCB – podaci prikupljeni kroz dvije godine u Italiji
Sirovo mlijeko	Dioxins	PO=FSO= odredba	Dioxini stabilni kemijski spojevi – nepotrebno je definirati PO. - Razina kontaminacije se ne povećava u masti tijekom proizvodnje, transporta, pohrane...

* Postupak uzorkovanja:

- Uskoro će biti dostupan industriji
- Model koji će uključiti učestalost uzorkovanja koja trenutno nije specificirana EU propisima



Proizvod	FSO	PO koji slijedi FSO	Uzorkovanje i pojašnjenje PO
Sirovo mlijeko	VTEC <i>E. coli</i>	PO M=0/25 ml, c=0; n=5.	Planovi uzorkovanja za mlijeko koje se prodaje sirovo Broj uzoraka - treba osigurati da se dosegne s malom vjerojatnošću vrijednost manja od infektivne doze (>100/g)
Mozzarella – Nepasterizirani sir, mlijeko bivolice	VTEC <i>E. coli</i>	PO M=0/ 25 g, c=0; n=5.	Nema mikrobioloških kriterija – nulta tolerancija – infektivna doza

Nepasterizirani i pasterizirani sirevi (kravlje i ovčje mlijeko)

Proizvod	FSO	PO koji slijedi FSO	Uzorkovanje i pojašnjenje PO
Nepasterizirani sir (kuhani sir, sirovo kravlje mlijeko) - +4°C	<i>Listeria monocytogenes</i>	PO max dopuštena koncentracija koja ne prelazi FSO	FSO = 1 cfu/10g
Nepasterizirani sir (kuhani sir, sirovo kravlje mlijeko) - +8°C	<i>Listeria monocytogenes</i>	PO max dopuštena koncentracija koja ne prelazi FSO	FSO = 5 cfu/20g
Pasterizirani polutvrđi i tvrđi sirevi (kravlje i ovčje mlijeko)	<i>Listeria monocytogenes</i>	PO = < 100 CFU/g	Otprema M=100 cfu/g; n=5; c=0 SPH garantira limit 100 cfu/g tijekom roka održivosti .. M= 0/25g; (n=5; c=0) – nema garancije SPH da će limit 100 cfu/g biti održiv.
Sirovo mlijeko	<i>Salmonella</i>	0 / 25ml	n=5, c=0
Polutvrđi sirevi (ovčje mlijeko)	<i>Salmonella</i>	0 / 25g	n=5, c=0





Hvala na pažnji