



# Challenge tesztek az élelmiszeriparban

**Gasparikné dr. Reichardt Judit**

Hungalimentaria, Budapest, 2023. 04. 18



## Challenge teszt fogalma, célja

- Challenge teszt: megfelelő laboratóriumi körülmények között oltásos kísérlettel **annak a modellezése, hogy meghatározott környezeti feltételek mellett egy adott patogén mikroba hogy viselkedik** (szaporodás/pusztulás) és jelent-e élelmiszer-biztonsági szempontból kockázatot.
- A challenge teszt alkalmas egy adott technológiai **folyamat/tárolás validálására** és a biztonságos fogyaszthatósági idő megállapítására.



## Mikor van szükség challenge tesztre?

- A kórokozók előfordulása élelmiszerekben véletlenszerű, ezért a termékeket kórokozókkal mesterségesen szennyezzük, hogy **megállapíthassuk a szaporodási sajátságokat**.
- Challenge tesztet új termék fejlesztése, meglévő **termékek összetételének megváltoztatása** vagy a **technológiai folyamat megváltoztatása** esetén használhatunk.
- A challenge tesztet többek között a **hőkezelési folyamatok validálásához** használják, de alkalmazható a **hűtlánokban tárolt termékek biztonságos minőség-megőrzési idejének meghatározásához is**.

## Példák a challenge tesztek használatára

Konzervgyártás  
hőkezelés-  
szükségletének  
megállapítása a spórák  
hőpusztulása alapján  
(1921 Bigelow és Ball)

*C. botulinum*  
túlélésének  
modellezésére  
oltás *C. sporogenes*  
mikrobával

*E. faecalis* túlélésének  
modellezése  
pasztőrözött  
húskészítményekben

Romlást okozó flóra (pl.  
élesztők) túlélésének  
vizsgálata

*L. monocytogenes*  
szaporodásának  
modellezése 2073/2005  
EU rendelet szerint

## Challenge tesztek

### Egy adott mikroba

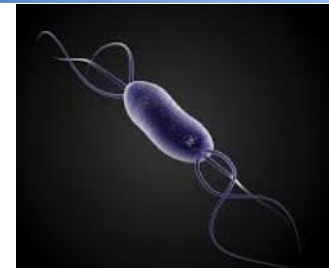
- pusztulásának vagy
- szaporodásának

vizsgálata modelltermékben, különböző környezeti tényezők hatásának figyelembe vételével:

pl. hőmérséklet (hőkezelési vagy tárolási), vízaktivitás, pH, adalékanyagok, füst, csomagolás stb.

### *Listeria monocytogenes:*

- a húsiparban alkalmazott hőkezelés elpusztítja
- DE a hőkezelt termékeknél utószennyeződéssel rákerülő mikroba veszélyt jelent a fogyasztó számára



## **Listeria monocytogenesre vonatkozó szabályozások változása**

- EN SANCO /1628/2008 ver. 9.3 Commission Staff Working Document Guidance Document on *Listeria monocytogenes* Shelf-Life studies for READY-TO-Eat Foods, under regulation (EC) No 2073/2005 of 15 Nov. on Microbiological Criteria for Foodstuffs
- AFFSA „Technological guidance document on shelf life studies for *L. mono-cytogenes* in ready-to-eat-foods, CRL for *L. monocytogenes*” ver. 2 Nov. 2008
- ANSES „EURL Lm technical guidance document for conducting shelf life studies on *L. monocytogenes* in ready-to-eat-foods” ver. 3 6 of June 2014
- ANSES ”EURL Lm technical guidance document for conducting shelf life studies on *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods” ver. 3 of June 2014 – Amendment 1 of 21 February 2019

## **Listeria monocytogenesre vonatkozó szabályozások változása**

- MSZ EN ISO 20976-1:2019 Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Az élelmiszertermékek és takarmányfélék „challenge” tesztjeire vonatkozó követelmények és irányelvek – 1 rész : „Challenge” tesztek a **növekedési potenciál**, a lappangási idő és a maximális növekedési sebesség vizsgálatára.
- **ANSES ”EURL Lm technical guidance document on challenge tests and durability studies for assessing shelf life of ready-to-eat food related to L. monocytogenes ” ver. 4 of July 2021**
- MSZ EN ISO 20976-02:2023 Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Az élelmiszertermékek és takarmányfélék „challenge” tesztjeire vonatkozó követelmények és irányelvek 2. rész „Challenge” tesztek az inaktiválási potenciál és a kinetikai paraméterek vizsgálatára
- Kozmetikum challenge teszt MSZ EN ISO 11930:2019  
Antimikrobás védelem értékelése

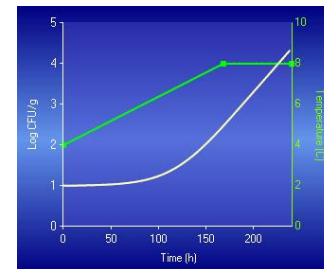
## Prediktív mikrobiológiai modellek

- A mikrobák szaporodását, inaktiválódását, túlélését, pusztulását az idő függvényében matematikai összefüggések alapján leíró modellek, különböző feltételek mellett (ComBase, Pathogen Combat, Growth Predictor)
- Döntést segítő eszköz – előszűrés / méréstervezés
- A mikrobaszaporodás előrejelzése adott környezetben
- Pl. pH, vízaktivitás, sótartalom, tartósítószer, mikroflóra  
A tárolási/szállítási hőmérséklet (statikus és dinamikus)



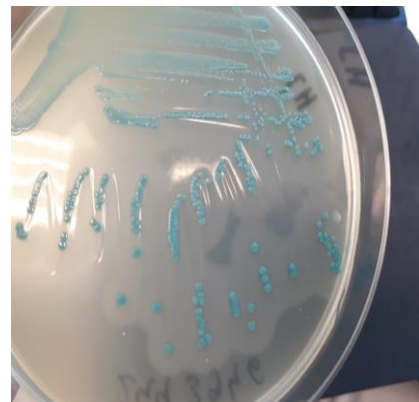
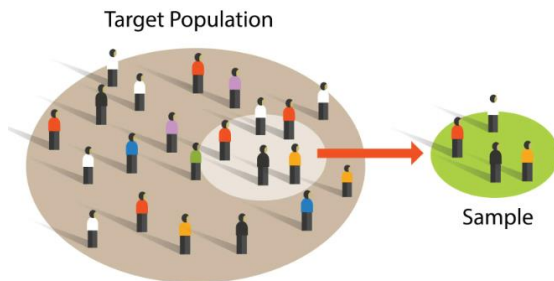
## Prediktív mikrobiológiai modellek

- A prediktív matematikai modellek **csak korlátozottan használhatók** a termék biztonságos minőség-megőrzési idejének és romlásának előrejelzésére.
- Nem képesek figyelembe venni a **valós körülmények összes tényezőjét**, pl. a versengő mikroflóra gátló hatását vagy a módosított légterű csomagolás hatását, ezért a valóságosnál gyorsabb szaporodást adnak eredményül.
- **Ez tehát egy döntést segítő eszköz** – előszűrésre alkalmas.



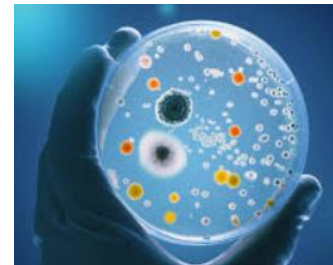
## Challenge teszt tervezésének fő szempontjai

- a beoltáshoz használt mikroorganizmusok kiválasztása,
- a vizsgált termék összetétele és természetes mikroflórája,
- a tárolási feltételek megválasztása,
- az inokulum és a beoltás módszere,
- mintavétel gyakorisága



## A beoltáshoz használt mikroorganizmusok kiválasztása

- A vizsgált termékből **korábban izoláltak és/vagy specifikációban, rendeletben rögzített**
- A „**koktél**” **organizmus beoltása** - pl. *Clostridium botulinum* proteolitikus és nem-proteolitikus alfajai,
- **Üzemi kísérlet esetén** ne legyen patogén: „biztonságos” mikroorganizmusok (surrogates) - pl. *Listeria monocytogenes* helyett *Listeria innocua*.
- Az összetétel és/vagy feldolgozás paramétereire (pl. hőmérséklet, pH,  $a_w$  stb.) hasonlóan viszonyuljon, mint a célpatógén,
- Stabil szaporodási jellemzőkkel rendelkezzen
- Könnyen elkülöníthető legyen a háttér mikroflórától



## A vizsgálandó termék jellemzői

### Belső tényezők

- Vízáktívitas
- pH-érték
- Tápanyagok
- Mikroflóra
- Só, tartósítószerék, fűszerek

### Külső tényezők

Hőkezelés

Csomagolás – védőgáz-összetétel

Tárolási hőmérséklet –  
idő/hőmérséklet profil

Relatív páratartalom



## Tárolási hőmérséklet megválasztása

- Az EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT útmutató 6.2.2.6 tárolási körülményekre vonatkozó fejezete alapján a tárolási hőmérsékletet a fogyaszthatósági idő
  - 1/3 arányában a gyártó által biztosított körülményekhez (manufacturer level),
  - 1/3 arányában a kiskereskedelmi körülményekhez (retail level),
  - 1/3 arányban a **fogyasztói tárolási** szokásokhoz (customer level) kell igazítani. ???

## Tárolási hőmérséklet megválasztása

- Pl. választott fogyasztói 1/3 hőmérséklet, ha a gyártó nem ad meg más hőmérsékletet, 4-6 °C-os gyártói paraméter esetén: 6 °C
- Indoklás: Fogyasztói szokásokról készült nemzetközi publikációban szereplő 5 ország esetében tapasztalt tárolási hőmérsékleteket átlagolva 5,54 °C -ot kapunk.
- Ez alapján fogyasztói szokásokat követő szakaszt 6 °C -nak vettük.

## Az inokulum

### Üzemben ne használjunk kórokozókat!

- A leggyakrabban egy valós romlásból/fertőzésből izolált tenyészet használata ajánlott.
- Általában a vegetatív sejteket optimális szaporodási hőmérsékletükön tartják 18-24 órával a beoltás előtt, majd hozzászoktatják őket a vizsgálni kívánt körülményekhez, pl. a hűtlánc hőmérsékletéhez. („Élesztés”)
- Beoltott sejtszám kiválasztásának megfontolásai
  - Hőkezelés validálása – pl. legalább 5 nagyságrendnyi csökkenés
  - Termékpálya felmérése – 50 -200 cfu/g

## A beoltás módszere

- A vizsgálandó élelmiszertől függ.
- A tesztek során a befecskendezési térfogat **ne változtassa meg az  $a_w$ -t, a tartósítószer koncentrációját vagy a pH-értéket** (max. 1%).
- Legegyszerűbb esetben a szuszpenziót hozzáadagoljuk a folyadékhoz vagy a magas víztartalmú élelmiszerhez, melyben nincs hatása a  $a_w$  -ra
- Míg csomagolt áruk esetén a csomagoláson keresztül is befecskendezhetjük az organizmusokat.
- Előfordulhat, hogy az élelmiszer felületére kell juttatni a mikroorganizmusokat (pl. pipettával, permetszóróval).
- Védőgáz-összetétel fenntartása (szeptum vagy újracsomagolás).



## A beoltás módszerei



- Inokulum bejuttatása szeptumon keresztül
- A vákuum- vagy védőgázos csomagolás gázösszetételének fenntartását a szeptum utólagos lezárásával lehet biztosítani

## Mintavétel gyakorisága

- A challenge teszt **időtartama, hőmérséklete** és a **beállított kísérleti körülmények** a kívánt fogyaszthatósági és/vagy vizsgálati időtartamot és hőmérsékletet jellemzik.
- A kezdeti és a végpontokban, illetve a kettő között legalább háromszor ajánlott mintát venni, hogy statisztikailag megfelelő mintaelem-számot kapjunk. **Σ: min. 5 minta**
- Fontos **információt tartalmaz, ha a fogyaszthatósági idő lejártá után is veszünk mintát** (ajánlott az 1/3-os ráhagyás), illetve ha az összmikrobaszám-változást is követjük kísérleteink során.
- **A termék természetes mikroflóráját is ajánlott feltérképezni** a challenge teszt előtt, az így kapott kontroll eredmények a kísérlet végső megértéséhez nagyban hozzájárulhatnak.

## Challenge tesztek eredményének értékelése

- A vizsgált mikroba **növekedési potenciáljának meghatározása** a kezdeti, a tárolás alatti és a tárolás végén kapott eredményekből
- **nem támogatja a *Listeria monocytogenes* szaporodását** a vizsgált időpontokban és a megadott tárolási hőmérsékleteken, mert a patogén növekedési potenciálja kisebb, mint **0,5** ( $\log_{0,5}$ ), így a termék a 2073/2005/EU rendelet 1.3. pontjába sorolható
- **támogatja a *Listeria monocytogenes* szaporodását** a vizsgált időpontokban és a megadott tárolási hőmérsékleteken, mert a patogén növekedési potenciálja nagyobb, mint **0,5** ( $\log_{0,5}$ ), így a termék a 2073/2005/EU rendelet 1.2. pontjába sorolható

**KÖSZÖNÖM A FIGYEMET!**