

# Belastningsstudier - et verktøy for håndtering av *Listeriarisiko* i spiseferdige produkter



# Belastningsstudier - et verktøy for håndtering av *Listeriarisiko* i spiseferdige produkter

## Innhold

Sammendrag .....	2
Bakgrunn.....	2
Hvor mye <i>L. monocytogenes</i> kan man akseptere i produktet på produksjonsdagen? .....	2
Eksempler på standard rutiner og korrigerende tiltak .....	3
Praktisk gjennomføring av belastningsstudier .....	6
Når er belastningsstudier nyttige?.....	7
Referanser .....	8

### Forfattere

Taran Skjerdal, Lena Haugland Moen og Kristin Sæbø Pettersen

ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2016

### Oppdragsgiver

Norges Forskningsråd, prosjektnummer 207765

### Samarbeidspartnere

Kjøtt- og fjørfebransjens Landsforbund  
Grilstad AS  
Lilleborg  
ISS Facility Services AS  
NHO Mat og Landbruk  
Animalia  
Nofima AS  
Nortura AS

Design omslag: Reine Linjer

Foto forside: xxx

## Belastningsstudier - et verktøy for håndtering av *Listeriarisiko* i spiseferdige produkter

### Sammendrag

*Listeria monocytogenes* kan overleve og vokse i mange matvarer. Regelverket setter en grense på maksimum 100 cfu/g i spiseferdige produkter gjennom hele holdbarhetstiden. Regelverket sier videre at det er bedriftenes eget ansvar å sikre dette. Kunnskap om *hvor mye* og eventuelt *hvor raskt* bakterien kan vokse i produktet i løpet av lagringstiden er et nyttig hjelpemiddel for å legge opp rutiner og avvikshåndtering slik at dette kravet kan møtes. Denne veilederen beskriver hvordan belastningsstudier kan brukes som hjelpemiddel i dette, og hva matprodusentene kan gjøre for å få så mye ut av studiene som mulig. Det gis også noen få eksempler på hvordan man kan håndtere *Listeriarisiko*en ved avvik.

### Bakgrunn

Veilederen er utarbeidet som en del av prosjektet «Kontroll av *Listeria monocytogenes* ved produksjon av animalske produkter». Prosjektperioden var 2012-2015 med Trond Møretrø som prosjektleder. Prosjektet ble finansiert av Forskningsmidlene for jordbruk og matindustri samt deltagende industri.

Takk til ansatte ved Nortura, Kjøtt- og fjørfeforbund, Grilstad, Animalia, Lilleborg, ISS Facility Services, NHO Mat og Landbruk, NOFIMA, Veterinærinstituttet og DTU i Danmark for bidrag underveis i prosjektet, og til Lone Flyvholm og andre ansatte ved Nortura for innspill etter gjennomlesing.

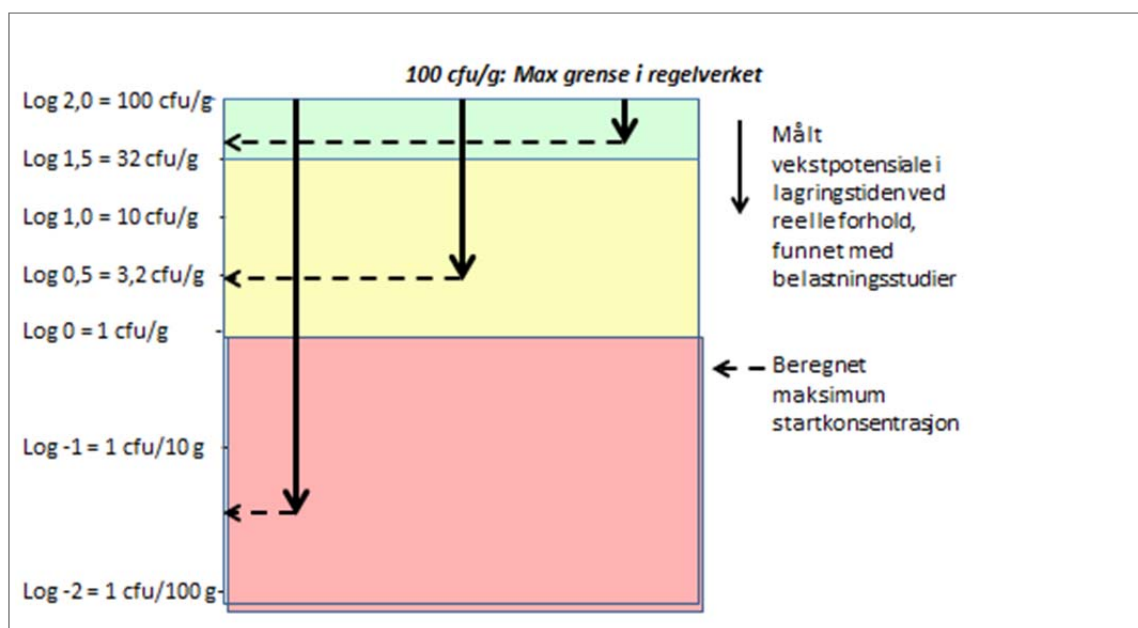
### Hvor mye *L. monocytogenes* kan man akseptere i produktet på produksjonsdagen?

Antallet listeriosetilfeller i Europa har økt de siste tiårene (EFSA 2015). Forbruket av spiseferdige produkter (ready-to-eat produkter) har også økt i samme periode. Man antar at forholdene har en sammenheng siden *L. monocytogenes* i produktet ikke drepes før det spises. Det er gjort omfattende, internasjonale risikoanalyser som tilsier at 100 cfu/g er tilstrekkelig lavt for å hindre sykdom. Det er denne vurderingen som ligger til grunn for grenseverdien i regelverket (se referanseliste, normative dokumenter). Det er verd å merke seg at grensen ikke er null. Det skyldes at *L. monocytogenes* kan finnes «overalt» og derfor ikke kan «lovreguleres bort».

Grenseverdien i regelverket gjelder gjennom hele lagringsperioden. Matprodusentene må kunne dokumentere at de har gjort en risikovurdering for å sikre at maksimumsgrensen av *L. monocytogenes* ikke overstiges i løpet av lagringsperioden. Dersom de ikke kan dokumentere tilstrekkelig vurdering, er kravet i regelverket fravær av *L. monocytogenes* i produktet når produsenten sender det på markedet.

Belastningsstudier er en prinsipielt enkel måte å vurdere hvor sterke tiltak som må iverksettes når man finner *L. monocytogenes* i produktene eller anlegget. Enkelt sagt, tar man utgangspunkt i maksimumsgrensen på 100 cfu/g, dvs 2 log cfu/g, trekker fra vekstpotensialet, og finner hvor høyt antall *L. monocytogenes* man kan tåle i produktet på produksjonsdagen uten at maksimumsgrensen brytes på slutten av lagringstiden (se figuren under). For produkter med lavt vekstpotensiale, kan man tåle mer forurensning før kriteriet brytes, mens det for produkter med svært høyt vekstpotensiale, kan det være nødvendig å kreve fravær av *L. monocytogenes*, ikke bare i produktet, men også i produksjonsmiljøet. Dersom det er sannsynlig at det er stor variasjon mellom produkter i batchen mht til kontaminering og vekstforhold for *L. monocytogenes*, bør tiltakene tilpasses ved at det

legges inn en sikkerhetsmargin. Vekstforholdene til *L. monocytogenes* avhenger av faktorer som temperatur, pH, vannaktivitet, pakkeatmosfære, konserveringsmidler, andre mikrober i produktet, og sammensetning av produktet.



Figur 1. Maksimum startantall av *L. monocytogenes* for å hindre produkter med mer enn 100 cfu/g hos forbruker, beregnet ut i fra vekstpotensiale.

Produkter kan kategoriseres ut fra hvor stort vekstpotensiale de har for *L. monocytogenes*. Fordelen med dette er at tilbaketreking av produkter med lavt vekstpotensiale kan unngås dersom man finner *L. monocytogenes* ved produksjon, uten å kompromisse på mattryggheten. Dersom man ikke kjenner vekstpotensialet i produktet, tilsier lovverket at bare Listeriafrie produkter skal sendes på markedet.

### Eksempler på standard rutiner og korrigerende tiltak

Tabellene på de neste sidene gir noen eksempler på standard rutiner og korrigerende tiltak ved avvik basert på hvor raskt *L. monocytogenes* vokser i produktet. Hensikten med dette er å vise hvordan internkontrollrutiner kan lages slik at man reduserer tap uten å kompromisse på mattrygghet. Listen over tiltak er ikke uttømmende, og den enkelte produsent må selv utvikle sine rutiner ut fra resultatene fra belastningsstudier.

Tabell 1. Eksempler på rutiner basert på kunnskap om vekstpotensialet til *L. monocytogenes* i produktet.

Planlegging av interne rutiner		
Lavt vekstpotensiale Mindre enn 0,5 log cfu/g	Middels vekstpotensiale Mellom 0,5 log cfu/g til 2 log cfu/g	Høyt vekstpotensiale Mer enn 2 log cfu/g
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sikre at startnivået av <i>L. monocytogenes</i> i produktet er maks 30 cfu/g.</li> <li>- Produktet kan merkes med «best før» dato</li> <li>- Tilbakekalling av produkter er ikke nødvendig med mindre det er hygieneavvik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sikre at startnivået av <i>L. monocytogenes</i> i produktet er maks 3 cfu/g*</li> <li>- Vurder reformulering eller konservering av produktet</li> <li>- Merk produktene med «holdbar til», ikke «best før».</li> <li>- Vurder tilbakekalling dersom temperaturavvik er større enn de det ble tatt høyde for i belastningsstudiet.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sikre at startnivået for <i>L. monocytogenes</i> i produktet er betydelig under 1 cfu/g*, for eksempel fravær i både produktprøver og miljøprøver.</li> <li>- Sterk fokus på hygiene</li> <li>- Vurder reformulering eller konservering av produktet</li> <li>- Sett kort holdbarhetstid og merk med «holdbar til», ikke «best før»</li> <li>- Følg kjølekjeden nøye og informer om viktigheten av god kjøling.</li> </ul>

\*Dagens standard analysemetoder for kvantitativ analyse har deteksjonsgrense på 10 cfu/g. Sensitive metoder for analyse av tilstrekkelig prøvemengde (10 eller 25 gram) er under uttesting. For dokumentasjonsformål kan startantall estimeres ut fra statistiske modeller og ekstrapolering av analysedata tatt i løpet av lagringen. Eksempler på dette er gitt i normative dokumenter og i Skjerdal et al (2014).

Tabell 2. Eksempel på håndtering av avvik basert på kunnskap om vekstpotensialet til *L. monocytogenes* i produktet.

Avvik	Eksempel på håndtering av avvik ved ulike vekstpotensialer for <i>L. monocytogenes</i> i produktet		
	Lavt vekstpotensiale Mindre enn 0,5 log cfu/g*	Middels vekstpotensiale Mellom 0,5 log cfu/g til 2 log cfu/g*	Høyt vekstpotensiale Mer enn 2 log/g*
Sporadisk funn av <i>L. monocytogenes</i> (lavt antall) i en produktprøve	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Økt renhold,</li> <li>- Ingen tilbaketrekking for vanlig distribusjon,</li> <li>- vurder tilbakekalling fra sykehus og institusjoner</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Økt renhold,</li> <li>- vurder tilbakekalling for vanlig distribusjon</li> <li>- Tilbaketrekking fra institusjoner</li> <li>- Økt prøvetaking en periode</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Økt renhold/nedvask.</li> <li>- Tilbaketrekking fra markedet</li> </ul>
Vedvarende funn av <i>L. monocytogenes</i> (lavt antall) i produktprøver	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Økt fokus på renhold, men ingen tilbaketrekking</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Økt fokus på renhold</li> <li>- Lever ikke produktet til utsatte forbrukere, vurder tilbaketrekking av utsendte produkter</li> <li>- Vurder å sette ned holdbarhetstiden til renholdet er funnet godt nok</li> <li>- Analyser produktprøver på siste forbruksdag for å sjekke og dokumentere om <i>Listeriatallet</i> går over 100 cfu/g.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vurder reformulering eller konservering av resepten</li> <li>- Senk lagringstemperatur</li> <li>- Sett ned holdbarhetstiden</li> </ul>
Brudd i kjølekjeden	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utbedre mangel</li> <li>- ingen øvrige tiltak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utbedre mangel</li> <li>- Mindre temperaturavvik enn det som er benyttet i belastningsstudiet: ingen ytterligere tiltak</li> <li>- Større temperaturavvik enn i belastningsstudiet: tilbaketrekking eller tilbakekalling</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utbedre mangel</li> <li>- Sjekke renholdsprøver</li> <li>- Tilbaketrekking eller tilbakekalling</li> </ul>

\*+0,5 log tilsvarer økning fra 1 bakterie til 3 bakterier i løpet av lagringstiden, eventuelt fra 10 til 30, 100 til 300, osv.

+2 log tilsvarer økning fra 1 til 100 bakterie i løpet av lagringstiden, eventuelt fra 10 til 1000, 100 til 10000, osv.

## Praktisk gjennomføring av belastningsstudier

Produkter som inneholder *L. monocytogenes* lagres på laboratoriet ved tid og temperatur forhold som tilsvarer lagringsforholdene hos produsent, i distribusjon og hos forbruker. Antallet *L. monocytogenes* måles underveis, og vekstpotensialet beregnes. Lagringen skal skje ved realistiske, ikke ideelle forhold.

Belastningsstudier kan gjøres på flere måter (for detaljer, se normative dokumenter). Hva som er den beste måten varierer fra produkt til produkt, hvor mye forhåndskunnskap som finnes for produktet og hvilket prøvemateriale man har tilgjengelig.

### Mulige framgangsmåter

Selve belastningsstudiet gjøres på et laboratorium som skal være lært opp til å gjøre slike studier, men produsenten må selv komme med dokumentasjon, prøvemateriale og opplysninger slik at forsøket gir så nyttig resultat som mulig. God planlegging i forkant er viktig, ikke minst fordi forsøkene er dyre, og fordi det slett ikke alltid er nødvendig å gjøre belastningsstudier (se nedenfor).

Det er tre hovedmåter å gjøre studiene på:

- med naturlig kontaminerte prøver
- med inokulerte prøver
- med datamodeller som predikerer veksten ut fra produktkarakteristikk

De ulike måtene har ulike styrker og svakheter. For en kritisk gjennomgang, se for eksempel Alvarez et al (2015).

### Naturlig kontaminerte prøver

Produkter som er naturlig kontaminerte med *L. monocytogenes* hos produsent er det beste utgangspunktet for belastningsstudier fordi mengdeforholdet mellom *L. monocytogenes* og andre bakterier, konserveringsmidler o.l. er riktig. Eventuelle hemmeeffekter fra produktet blir derfor påvist på en representativ måte. Ulempen med naturlig kontaminerte prøver er at man ikke kjenner antallet *L. monocytogenes* fra starten av, fordi analysemetodene ikke er nøyaktige nok for lave antall *Listeria*. Man må regne med betydelig variasjon, for eksempel at en prøve kan ha 1 *Listeria* per gram, mens en annen kan ha 1 bakterie per 150 gram. I den førstnevnte prøven tar det ca 7 generasjonstider (bakterier deler seg ved dobling, slik: 1-2-4-8-16-32-64-128) før *Listerial*tallet når 100 per gram, mens det i den sistnevnte tar ca 15 generasjonstider. Variasjonen gjør at man må ta et stort antall prøver og/eller ta flere prøver i løpet av lagringstiden. Med naturlig kontaminerte prøver får man imidlertid svært god oversikt over hvor stor andel av positive prøver som går over 100 *L. monocytogenes* per gram ved holdbarhetstidens slutt. Det er dette som er den viktige parameteren for vurdering av mattryggheten for forbrukeren. Slik sett representerer slike prøver «fasiten» på belastningsstudier som utføres på andre måter. Vel å merke for bedriften prøvene kommer fra. I andre bedrifter og produkter kan kontamineringsmengden være annerledes, og følgelig blir fraksjonen av prøver med mer enn 100 cfu/g annerledes.

Kategoriene i tabell 1 er basert på hvor mye *L. monocytogenes* vokser, ikke på hvor høyt antallet er til slutt. Kategoriene kan «oversettes» til hvor stor frekvens av prøver med *L. monocytogenes* over 100 cfu/g man har. Grensene mellom kategoriene må vurderes i hvert enkelt tilfelle. Laboratorier og rådgivere med kompetanse i risikovurdering kan bidra med dette.

### Inokulerte prøver

Forsøk med inokulerte prøver, dvs at *L. monocytogenes* er tilført produktet på laboratoriet, fokuserer på veksten av *L. monocytogenes* mer enn på sluttkonsentrasjonen. Forsøkene er designet slik at man får fram et verst tenkelig tilfelle under så realistiske betingelser som mulig. Det brukes en blanding av flere stammer av *L. monocytogenes* som er valgt ut fra kriteriene at de før er funnet i lignende produkter og at de vokser raskt. De dyrkes opp på forhånd slik at de er tilpasset kald temperatur og kan begynne å vokse med en gang de kommer inn i produktet. For å få målbare data, tilføres det ca 100 bakterier per gram ved

starten av forsøket. Med disse betingelsene oppnår man klare resultater slik at produktene kan kategoriseres ut fra vekstpotensialet på samme måte som i regelverket og i tabell 1 og 2. Ulempen med inokulerte prøver er at veksten i noen tilfeller overestimeres. Det kan skyldes at *Listeria*stammen i de naturlig kontaminerte prøvene vokser langsommere enn de som tilføres, at *L. monocytogenes* som løsner fra overflater og utstyr i bedriften noen ganger trenger en nølefasen før de begynner å vokse i produktet, og/eller at hemmeeffekten av konserveringsmidler og bakgrunnsflora i produktet blir mindre jo flere *L. monocytogenes* de har å «kjempes mot». For mange produkter er det imidlertid bare snakk om små forskjeller mellom de to framgangsmåtene. Et viktigere unntak er produkter som har noe melkesyrebakterier i bakgrunnsfloraen, der er det observert store forskjeller.

Måling av vekstpotensiale av *L. monocytogenes* i naturlig kontaminerte og inokulerte prøver skal gjøres ved realistiske tid-temperatur forhold fra produksjon via distribusjon til forbruker. Dersom temperaturforholdene ikke kan dokumenteres, sier de europeiske retningslinjene at man skal anta 8 grader i produksjonsfasen, 12 grader i distribusjonsfasen og 12 grader hos forbruker. Ved så høye temperaturer vokser *L. monocytogenes* raskt i svært mange produkter. I Norge er det vanligvis kaldere kjøledisker og lager, og det godtas lavere temperatur og følgelig blir målt vekstpotensiale for *L. monocytogenes* i produktene oftest lavere. Det er viktig at forsøket skal skje ved reelle forhold, ikke ideelle forhold. I løpet av 2016 vil det Europeiske referanselaboratoriet for *Listeria* komme med en rapport om hva som er rimelige temperaturscenarier i hvert land.

#### Estimering av vekst ved andre tid-temperatur forhold enn de er målt for

Belastningsforsøk er dyre, og valg av tid-temperatur regime må derfor gjøres med omhu. Retningslinjene for belastningsstudier angir to muligheter for å anslå veksten ved andre forhold enn de er målt for. Den ene er å måle veksthastighet i stedet for vekstpotensiale. Framgangsmåten er i prinsippet den samme som for inokulerte prøver, men det kreves mange flere prøver fordi dataene skal brukes til å tilpasse en vekstmodell. Fordelen med denne framgangsmåten er at man kan beregne teoretisk veksthastighet ved andre temperaturer enn den er målt ved. Prinsippet bak dette er at øvre og nedre grenseverdi for hhv pH, vannaktivitet og temperatur for vekst av *L. monocytogenes* er den samme i alle produkter. Den optimale pH, vannaktiviteten og temperaturen er også den samme, slik at formen på kurven for veksthastighet som funksjon av fysiske forhold blir den samme. Dette betyr, at om man kjenner veksthastigheten ved en temperatur i produktet, så kan man beregne den for alle andre, forutsatt at modellen er gyldig. Det er oppnådd gode resultater for mange produkter med denne framgangsmåten, men ikke for produkter med melkesyrebakterier. Det anbefales å ta kontakt med laboratorier eller rådgivere med spesialkompetanse på området før man setter i gang med slike studier.

#### Datamodeller som predikerer veksten ut fra produktkarakteristikk

Retningslinjene åpner også for å gjøre belastningsstudier ved hjelp av prediktive modeller, uten å gjøre praktiske forsøk. En del produkter er blitt meget grundig studert i forskning, der det er utviklet modeller der man kan legge inn data om gitt temperaturregime ved lagring sammen med pH, vannaktivitet, tilsetningsstoffer og eventuelt bakgrunnsflora i produktene. Modellene gir mulighet til å se konsekvensen av endringer i produktsammensetning og lagringsforhold, og er slik sett svært nyttige. Modeller som er utviklet med basis i andre produkter enn den man selv ønsker å undersøke må imidlertid brukes med stor forsiktighet. Det anbefales derfor å ta kontakt med laboratorier eller rådgivere med spesialkompetanse på området for å sjekke om modellene er egnet for produktene som skal undersøkes.

#### Når er belastningsstudier nyttige?

- Belastningsstudier er bare nødvendig for spiseferdige produkter.
- Belastningsstudier kan også ha verdi for reseptutvikling slik at lavt vekstpotensiale kan tilstrebese
- Belastningsstudier er ikke påkrevd for utilsiktet spiseklare produkter, det vil si produkter som spises uten varmebehandling selv om produsenten angir at de skal varmes, at varmebehandlingen som angis ikke følges, eller at *L. monocytogenes* overlever ved angitt varmebehandling. Belastningsstudier vil imidlertid gi nyttig informasjon for å vurdere konsekvensen av mangelfull varmebehandling.



- Det er ikke nødvendig å teste produkter som åpenbart ikke gir vekst av *Listeria*, så som svært sure og tørre produkter. Grenseverdier finnes i lovverket.
- Dersom det er gjort studier med tilsvarende produkter tidligere, kan man henvise til disse, og selv verifisere at produktene er sammenlignbare.
- Testede, prediktive modeller kan benyttes som alternativ til belastningsstudier
- Bransjeaktører kan samarbeide om å gjøre belastningsstudier.

Belastningsstudier kan ikke:

- Erstatte prøvetaking, men de kan brukes til å redusere omfanget.
- Erstatte all annen risikovurdering av *Listeria*. Dersom produktene er sterkt forurenset med *Listeria*, vil antallet kunne gå over 100/g selv om produktet gir lite vekst.
- Erstatte risikovurdering av andre agens, så som *E.coli*.

## Referanser

Normative dokumenter

1. Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf life studies for ready to eat foods under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, Commission of the European Communities, SANCO/1628/2008
2. Guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, version 3 - 6 June 2014
3. Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs amended (2007)

Øvrig litteratur

4. Alvares Ordonez A, Leong, Hickey B, Beaufort A, Jordan K, 2015. The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. *Food Res Int* 75, 233-243
5. EFSA, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014
6. Skjerdal T, Reitehaug E, Eckner K, 2014. Development of performance objectives for *Listeria monocytogenes* contaminated salmon (*Salmo salar*) intended used as sushi, sashimi and cold smoked salmon based on analyses of naturally contaminated samples. *Int J Food Microbiol* 184:8-13
7. Skjerdal T, Reitehaug E, Cudjoe C, Næss T, Folgerø B, Framstad K, 2011. *Listeria* shelf life of ready-to-(h)eat red and white meat products. Poster presentation at Food Micro, Copenhagen

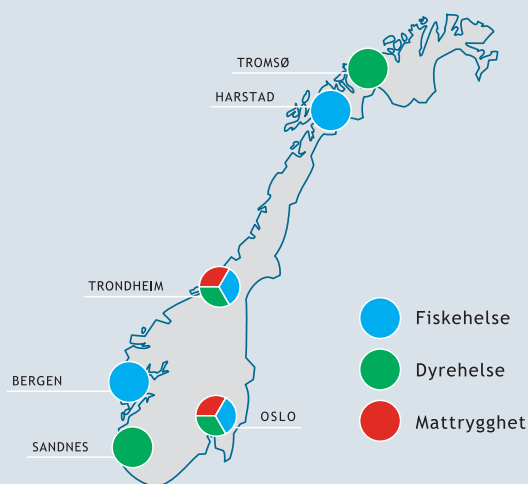
*Faglig ambisjos, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!*

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primær oppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er viktige områder. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, utredninger og råd.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.

Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



**Oslo**  
postmottak@vetinst.no

**Trondheim**  
vit@vetinst.no

**Sandnes**  
vis@vetinst.no

**Bergen**  
post.vib@vetinst.no

**Harstad**  
vih@vetinst.no

**Tromsø**  
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



**Veterinærinstituttet**  
Norwegian Veterinary Institute