

5 octobre 2006

## PROCOLE DE MISE EN ŒUVRE DES CHALLENGE TESTS

### RELATIFS A *LISTERIA MONOCYTOGENES*

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>2. BASES REGLEMENTAIRES .....</b>	<b>3</b>
<b>3. CLASSIFICATION DES DENREES ALIMENTAIRES .....</b>	<b>3</b>
<b>4. DÉFINITION D'UN CHALLENGE TEST.....</b>	<b>5</b>
<b>5. PROCOLE D'UN CHALLENGE TEST.....</b>	<b>6</b>
5.1. DESCRIPTION DU PRODUIT ET DU PROCEDE DE FABRICATION.....	6
5.1.1. <i>Procédé de fabrication.....</i>	6
5.1.2. <i>Denrée alimentaire .....</i>	7
5.2. INOCULATION DE L'ALIMENT .....	7
5.2.1. <i>Choix des souches .....</i>	7
5.2.2. <i>Préparation de l'inoculum.....</i>	7
5.2.3. <i>Inoculation de l'aliment.....</i>	8
5.3. TEST DE CROISSANCE .....	9
5.3.1. <i>Conditions de conservation de la denrée alimentaire inoculée.....</i>	9
5.3.2. <i>Nombre d'analyses par lot de produit .....</i>	9
5.3.3. <i>Nombre de lots .....</i>	9
5.4. ESSAIS MICROBIOLOGIQUES .....	10
5.4.1. <i>Méthode d'analyse .....</i>	10
5.4.2. <i>Présentation des résultats.....</i>	10
<b>6. MODALITÉS D'INTERPRÉTATION D'UN CHALLENGE TEST .....</b>	<b>11</b>
6.1. PROCOLE LIMITE .....	11
6.2. PROCOLE COMPLET .....	12
<b>7. ANNEXES.....</b>	<b>16</b>

## 1. Introduction

Cette procédure a été rédigée par le Laboratoire National de Référence en microbiologie des denrées alimentaires de l'Université de Liège à la demande de l'AFSCA. Il est basé sur un avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments nommé « Avis sur la révision de l'avis 2000-SA-0094 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance (Saisine n° 2003-SA-0362) ». Il tient compte de l'avis du Comité Scientifique de l'AFSCA (dossier Sci Com 2005/49). Ce document constitue un guide pour la mise en œuvre d'un certain nombre de dispositions relatives à *Listeria monocytogenes* tirées du Règlement (CE) n°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Il sera utilisé comme guide par les fabricants pour effectuer les études sous-mentionnées, et par les inspecteurs/contrôleurs de l'AFSCA pour évaluer ces études. Il y a lieu de souligner que les directives mentionnées dans le document sont indissociables du système d'autocontrôle (HACCP) qui est d'application dans une entreprise du secteur alimentaire. Plus précisément ce document a pour but d'identifier les points importants permettant d'évaluer un protocole de test de croissance ou challenge test pour *L. monocytogenes* dans les produits prêts à être consommés (ready-to-eat).

*Listeria monocytogenes* est un microorganisme psychrotrophe (adapté aux températures de réfrigération), pouvant se multiplier à une température minimale de  $-3^{\circ}\text{C}$ , maximale de  $45^{\circ}\text{C}$ , et de façon optimale à  $37^{\circ}\text{C}$ . L'activité de l'eau minimale ( $a_w$ ) à laquelle *L. monocytogenes* peut se développer est de 0,92, ce qui correspond notamment à 11,9% de NaCl. Ce microorganisme peut se multiplier dans une gamme de pH allant de 4,4 à 9,4, son optimum étant de 7,0. *L. monocytogenes* peut cependant survivre en dehors de ces limites.

## **2. Bases réglementaires**

Ces challenge tests s'inscrivent dans le cadre du Règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Celui-ci fixe les critères de sécurité alimentaire suivants pour *Listeria monocytogenes* dans les denrées alimentaires prêtes à être consommées, non destinées aux nourrissons ou à certaines fins médicales :

A / Si la denrée permet la croissance de *L. monocytogenes* :

1. une limite de 100 unités formant colonies (ufc/g) pendant toute la durée de vie de l'aliment, ou
2. l'absence dans 25 g avant que l'aliment ne quitte le contrôle immédiat du fabricant.

Le premier critère peut être appliqué si le fabricant peut démontrer à la satisfaction de l'autorité compétente que l'aliment ne dépassera pas cette limite pendant toute sa durée de vie. Si le fabricant ne peut pas le démontrer à la satisfaction de l'autorité compétente, c'est le deuxième critère qui est d'application.

B/ Si la denrée ne permet pas la croissance de *L. monocytogenes* : une limite de 100 ufc/g pendant la durée de vie de l'aliment doit être respectée.

## **3. Classification des denrées alimentaires**

Selon l'article 3, point 2 du Règlement (CE) n°2073/2005, les exploitants du secteur alimentaire sont tenus de réaliser des études pour vérifier si les critères mentionnés précédemment sont respectés pendant toute la durée de vie des aliments. Ceci vaut en particulier pour les denrées prêtes à être consommées permettant la croissance de *L. monocytogenes*.

Dans le cadre du challenge test, les aliments peuvent être regroupés en 5 catégories (tableau I). Des exemples de denrées alimentaires appartenant aux différentes catégories sont donnés en annexe 1.

En pratique, on parvient généralement à empêcher le développement de *L. monocytogenes* par une combinaison de facteurs (par ex. abaissement du pH, de l'activité de l'eau et de la température, éventuellement combiné à l'utilisation d'agents conservateurs comme des acides organiques, ou d'un emballage sous atmosphère modifiée). Dans le document « croissance et survie de *Listeria monocytogenes*: mesures de prévention dans la chaîne alimentaire »<sup>1</sup>, un certain nombre d'exemples de combinaisons empêchant le développement de *L. monocytogenes* sont donnés (annexe 2).

---

<sup>1</sup> F. Devlieghere, M. Uyttendaele, Laboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie en –conservering, Universiteit Gent

Tableau I : catégories d'aliments à considérer dans le cadre des challenge tests.

catégorie 0	<p>Aliments exemptés de challenge test par le règlement (CE) n° 2073/2005.</p> <p>« Des essais périodiques fondés sur ce critère ne sont pas utiles, en temps normal pour les denrées alimentaires prêtes à être consommées suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- denrées alimentaires ayant fait l'objet d'un traitement thermique ou d'une autre transformation efficace pour éliminer <i>L. monocytogenes</i>, lorsque la recontamination n'est pas possible après ce traitement (par exemple les produits traités thermiquement dans leur emballage final),</li> <li>- fruits et légumes frais, non découpés et non transformés, à l'exception des graines germées,</li> <li>- pain, biscuits et produits similaires,</li> <li>- eaux, boissons non alcoolisées, bière, cidre, vin, boissons spiritueuses en bouteille ou conditionnés et produits similaires,</li> <li>- sucre, miel, et confiserie, y compris les produits à base de cacao et de chocolat,</li> <li>- mollusques bivalves vivants. »</li> </ul>
catégorie 1	<p>Aliments qui vont subir un procédé assurant une destruction de <i>L. monocytogenes</i> suffisante au stade de leur consommation.</p>
catégorie 2	<p>Denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées aux nourrissons et denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées à des fins médicales.</p>
catégorie 3	<p>Cette catégorie comporte :</p> <p>3.1 Les aliments dont les propriétés physico-chimiques permettent d'exclure la multiplication de <i>L. monocytogenes</i>, c'est-à-dire :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\text{pH} \leq 4,4</math> (ou <math>\text{pH} \leq 4,5</math> si l'acidification est obtenue avec de l'acide lactique ou de l'acide acétique) ;</li> <li>- <math>a_w \leq 0,92</math> ;</li> <li>- <math>\text{pH} \leq 5,0</math> et <math>a_w \leq 0,94</math> ;</li> <li>- produit congelé ou surgelé.</li> </ul> <p>3.2 Les aliments qui présentent une durée de conservation inférieure à 5 jours</p> <p>3.3 Les aliments dont l'absence de croissance est suggérée par des données scientifiques confortées par un challenge test limité de vérification.</p>
catégorie 4	<p>Aliments prêts à être consommés et dans lesquels <i>L. monocytogenes</i> peut se multiplier.</p>

#### 4. Définition d'un challenge test

Un **test de croissance** ou **challenge test** correspond à une expérience destinée à évaluer l'accroissement de la population d'un microorganisme (généralement identifié comme un danger) dans une denrée alimentaire inoculée artificiellement avec une culture connue de ce microorganisme, et analysée dans les conditions raisonnablement prévisibles de son utilisation. Il s'agit de tests permettant de définir un potentiel de croissance, soit à une température constante, soit au cours d'un profil temps / température (simulant par exemple la chaîne du froid avec rupture). Le **potentiel de croissance** est la différence entre le logarithme décimal de la concentration après croissance et le logarithme décimal de la concentration initiale (la durée pouvant inclure la phase de latence et/ou la phase exponentielle et/ou la phase stationnaire). Dans la définition du potentiel de croissance, il faut tenir compte de l'incertitude de mesure. L'annexe 3 de cet avis donne de plus amples informations sur l'incertitude de mesure des déterminations microbiologiques quantitatives (dénombrements). Normalement, cette incertitude de mesure doit être déterminée par chaque laboratoire accrédité effectuant les dénombrements. Sur le terrain, on présume souvent que l'incertitude de mesure d'un dénombrement microbiologique est de  $\pm 0,5$  unités log.

Les denrées alimentaires de catégorie 0 et 1 ne doivent pas subir de challenge test et ne sont pas soumis à des critères microbiologiques légaux concernant *Listeria monocytogenes*. Les produits de catégorie 2 doivent constamment respecter le critère « absence dans 25 grammes ». Le but du challenge test pour les denrées alimentaires de catégorie 3 est de confirmer les données scientifiques et les modèles prévisionnels selon lesquels la multiplication de *L. monocytogenes* n'est pas possible. Le challenge test appliqué est dit « limité ». Le challenge test concernant les denrées alimentaires de catégorie 4 a pour but l'estimation du potentiel de multiplication de *L. monocytogenes*. Un organigramme de décision se trouve en annexe 4.

Si on estime qu'un aliment fait partie de la **catégorie 3** sur base de données scientifiques publiées (éventuellement étayées à l'aide des modèles prévisionnels), et si cet aliment ne satisfait pas aux caractéristiques énumérées dans ce document (ou dans le Règlement (CE) N°2073/2005 ou dans un autre texte réglementaire) en matière de pH, d'activité de l'eau, de congélation/surgélation ou de durée de conservation, il est impératif de tester si cet aliment ne permet pas, en effet, le développement de *L. monocytogenes*. Ce test de vérification consiste en un unique challenge test limité dans lequel l'aliment est inoculé avec *L. monocytogenes* et où la concentration de *L. monocytogenes* est déterminée le jour 0 et en fin de conservation. C'est seulement si aucun développement n'est constaté (compte tenu de l'incertitude de mesure de la détermination quantitative microbiologique) que la catégorie 3 est d'application.

Pour les aliments de la **catégorie 4**, des tests de croissance doivent être réalisés pour démontrer que le produit ne dépassera pas la limite de 100 ufc/g pendant toute sa durée de vie microbiologique. Le principe général veut que les pathogènes doivent autant que possible être absents de la chaîne alimentaire. Le Règlement (CE) N°2073/2005 (Annexe I, Chapitre 1, catégorie 1.2, note 5) indique que si *L. monocytogenes* est néanmoins présent par accident, le niveau de contamination toléré à la sortie de production doit être tel que la limite de 100 ufc/g citée par le Règlement (CE) N°2073/2005 soit respectée à la date limite de consommation. La valeur de tolérance à la sortie de production dépend du potentiel de *L. monocytogenes* à se multiplier dans l'aliment en question dans les conditions de conservation et pendant le délai de conservation prescrits. Cette croissance sera quantifiée au moyen de challenge tests (où le pathogène est artificiellement inoculé dans/sur l'aliment), dont les résultats seront étayés par la littérature scientifique ou des modèles de prédiction. Si le potentiel de croissance de *L. monocytogenes* ne peut pas être étayé par le fabricant, il faut utiliser le critère « absence dans 25 g ». Pour ces aliments de la catégorie 4, un challenge test à deux points, en l'occurrence le jour 0 (jour de sortie de production) et à la date limite de consommation (DLC) sera réalisé, afin d'estimer le potentiel de croissance de *L. monocytogenes* dans l'aliment dans les conditions de conservation prescrites. Ce potentiel de croissance permettra de déduire la valeur de tolérance pour *L. monocytogenes* à la sortie de production. Cette valeur de tolérance sera utilisée, d'une part par le fabricant dans le cadre des autocontrôles du système HACCP, et d'autre part par l'autorité compétente pour contrôler le respect du critère du Règlement (CE) N°2073/2005 (Annexe I, Chapitre 1, catégorie 1.2). La réalisation d'un challenge test à plusieurs points de mesure peut fournir des informations additionnelles intéressantes pour le fabricant, mais n'est pas strictement nécessaire pour l'établissement de la valeur de tolérance, puisque seuls les points de mesure le jour 0 et en fin de conservation (DLC) seront pris en compte. L'obtention d'une véritable courbe de croissance nécessite, quant à elle, un minimum de 10 points de mesure afin de déterminer de manière fiable la phase de latence et le taux de croissance<sup>2</sup>.

## **5. Protocole d'un challenge test**

### ***5.1. Description du produit et du procédé de fabrication***

#### **5.1.1. PROCEDE DE FABRICATION**

Un descriptif succinct du procédé de fabrication doit être disponible. Cette description peut être déduite du système HACCP disponible dans l'entreprise. Elle doit mettre en exergue les étapes critiques du procédé permettant la contamination de l'aliment par *L. monocytogenes* de même que celles permettant sa multiplication ou sa survie.

---

<sup>2</sup> Walker SJ and Jones JE (1993). Protocols for data generation for predictive modelling. J. Industrial Microbiology, 12, 273-276

### **5.1.2. DENREE ALIMENTAIRE**

Les caractéristiques du produit doivent être décrites : caractéristiques physico-chimiques (pH, aw, contenu en sel, concentration en conservateurs), structure, type de conservation (congelé, surgelé, frais), conditionnement (sous vide, sous atmosphère modifiée...). Il en va de même pour tout autre facteur pouvant influencer le comportement de *L. monocytogenes* et dont il faudra tenir compte dans le test. Il faut également expliquer le profil temps / température prévu pour l'aliment, c'est-à-dire les combinaisons temps / température (que l'on s'attend à voir respectées) pendant le stockage interne dans l'établissement, pendant le transport, pendant l'éventuel stockage intermédiaire dans le centre de distribution, pendant l'étalage dans les comptoirs frigorifiques du commerce de détail et pendant la conservation chez le consommateur. La durée maximale de conservation doit également être clairement indiquée.

La nature des flores annexes habituellement rencontrées et les habitudes raisonnablement prévisibles et le niveau de consommation doivent être mentionnés. Il faut également rassembler les données de surveillance ou de contrôle du produit concerné (autocontrôles de l'établissement ou de la filière, données bibliographiques, plans de surveillance).

## **5.2. Inoculation de l'aliment**

### **5.2.1. CHOIX DES SOUCHES**

Au moins deux souches isolées de préférence de l'aliment sont choisies et étudiées. Il faut utiliser de préférence des isolats bien identifiés et dont les caractéristiques de croissance et la morphologie ont été étudiées. Il n'est pas toujours possible d'isoler et d'identifier correctement une souche de l'aliment en question. On peut donc utiliser des souches isolées d'une matrice de même nature. Il n'est pas nécessaire d'étudier séparément les deux souches sélectionnées. Après culture, les différentes souches peuvent être mélangées préalablement à leur inoculation dans la denrée alimentaire en question. Il n'est, en effet, pas nécessaire de vérifier pour les deux souches séparément si elles peuvent se développer dans l'aliment en question.

### **5.2.2. PREPARATION DE L'INOCULUM**

La température de culture sera choisie de sorte qu'une culture standardisée de cellules en phase stationnaire soit obtenue, ce qui permet d'obtenir facilement la concentration initiale visée (ufc/g d'aliment). Cela peut être obtenu, par exemple, après une culture à une température suffisante pour permettre la multiplication de *L. monocytogenes* (par exemple 14°C) pendant un temps suffisant pour atteindre la phase stationnaire, suivie par une conservation pendant environ 12 heures à la température de consigne (en général 4°C pour les denrées réfrigérées). Des études préliminaires sont donc nécessaires pour assurer une planification et réalisation correctes du challenge test.

Le nombre initial de cellules dans l'aliment doit être assez élevé pour limiter les effets de la variabilité de la croissance dus à de faibles niveaux d'inoculum. Les cellules individuelles présentent, en effet, une grande variabilité en ce qui concerne la longueur de la phase de latence<sup>3</sup>. On doit inoculer au minimum de 100 à 1000 cellules par portion d'aliment utilisée dans le challenge test. L'inoculation de nombres trop élevés de *L. monocytogenes* n'est pas non plus recommandée parce qu'elle est peu réaliste au regard des niveaux de contamination rencontrés dans les échantillons naturellement contaminés, et parce que la flore compétitive est alors entièrement masquée et qu'on obtient souvent une surestimation du potentiel de croissance. Il est recommandé de choisir un niveau d'inoculum qui soit réaliste tout en permettant d'obtenir des nombres comptables (i.e. 10 ufc/g au minimum). Pour obtenir une concentration initiale inférieure à 100 ufc/g, il faut choisir soigneusement la taille de la portion d'aliment qui sera testée. En outre, on doit déterminer aussi bien avant qu'immédiatement après l'inoculation la concentration de *L. monocytogenes* de l'inoculum et de l'aliment, étant donné qu'il peut toujours y avoir des cellules de *L. monocytogenes* présentes dans l'aliment avant l'inoculation.

### 5.2.3. INOCULATION DE L'ALIMENT

L'inoculation doit simuler le mieux possible les conditions naturelles de contamination. Différentes modalités d'inoculations sont explicitées dans le tableau II. L'inoculation est réalisée en modifiant le moins possible la structure, la composition, les propriétés physico-chimiques, la flore microbienne naturellement présente et le conditionnement de l'aliment. Elle doit en outre assurer une répartition la plus homogène possible dans les zones prélevées pour analyse. Le volume de l'inoculum doit être suffisant pour permettre cette bonne répartition mais ne doit pas être trop élevée pour ne pas modifier les propriétés de substrat de croissance de la denrée alimentaire.

Tableau II. Modalités d'inoculation

Lieu(x) d'inoculation	Contamination naturelle simulée	Exemple
En profondeur et en surface	Aliments préparés par mélange de plusieurs matières premières dont l'une peut être contaminée	Salade composée, produit haché, produit divisé
En surface	Post-contamination après un traitement listéricide	Pâté, jambon

<sup>3</sup> François K (2005). Effect of environmental and precultural conditions on the lag phase of *Listeria monocytogenes* at the individual cell level. PhD dissertation, Ghent University, Laboratory of Food Microbiology and Preservation

### **5.3. Test de croissance**

#### **5.3.1. CONDITIONS DE CONSERVATION DE LA DENREE ALIMENTAIRE INOCULEE**

Les conditions de conservation appliquées durant le test de croissance doivent respecter les obligations réglementaires et les conditions auxquelles est soumise le produit commercialisé jusqu'à sa consommation finale.

Le test de croissance est soit réalisé à une température fixe, soit à des températures variables. Dans le premier cas, une même température, qui sera justifiée, sera utilisée pendant toute la durée de conservation. Elle doit correspondre à la température la plus probable de conservation dans le cas d'une maîtrise totale de la chaîne du froid jusqu'à la consommation.

Dans le deuxième cas, un profil temps / température doit être défini. La durée et la température de chaque étape de la vie du produit (en prenant en compte les différentes ruptures possibles de la chaîne du froid) devront être justifiées et choisies en envisageant les conditions réalistes les plus favorables à la croissance bactérienne. Ce profil temps / température doit être standardisé. En l'absence de norme internationale à suivre, le profil sera choisi de manière à ce que la denrée alimentaire soit incubée durant 1/3 de la durée du challenge test à une température  $T_1$ , et durant 2/3 de la durée à une température  $T_2$ ,  $T_1$  représentant la température chez le fabricant (stockage interne) ou la température légale de conservation, et  $T_2$  la température moyenne d'un réfrigérateur ménager en Belgique (cette dernière peut, par ex., être estimée sur base des données tirées de l'enquête sur les habitudes alimentaires). Le respect des températures de conservation doit être garanti par le système d'assurance qualité du laboratoire.

#### **5.3.2. NOMBRE D'ANALYSES PAR LOT DE PRODUIT**

L'objectif est d'évaluer l'accroissement de la population de *L. monocytogenes* au cours de la conservation. Afin de tenir compte de l'éventuelle hétérogénéité au sein d'un lot, il faut tester au moins deux unités par lot, c'est-à-dire qu'à chaque lot examiné deux tests de croissances doivent être réalisés en parallèle, avec analyse au jour 0 et à la DLC.

#### **5.3.3. NOMBRE DE LOTS**

Le nombre de lots testés sera d'autant plus grand que les lots de fabrication présentent une hétérogénéité entre eux, avec un minimum de deux lots pour les challenge tests limités pour s'assurer qu'un aliment appartient bien à la catégorie 3, ou avec un minimum de trois lots étudiés pour évaluer les potentialités de croissance de *L. monocytogenes* dans une denrée de catégorie 4.

Le nombre de challenge tests doit être augmenté en fonction du degré d'hétérogénéité au sein d'un lot et entre les lots, de la mesure dans laquelle le lot représente ou non un "worst case scenario" de l'aliment, de la marge de sécurité relative à la valeur de tolérance fixée le jour 0, du degré de mise en place et de vérification du plan HACCP au sein de l'entreprise (voir exemples au point 6).

## **5.4. Essais microbiologiques**

### **5.4.1. METHODE D'ANALYSE**

La méthode d'analyse (dénombrement de *Listeria monocytogenes*) doit faire partie de la liste des méthodes reconnues par l'AFSCA. Le laboratoire réalisant les dénombrements de *L. monocytogenes* doit être agréé par l'AFSCA pour ce paramètre. Les dénombrements de *L. monocytogenes* étant de l'ordre de 10-100 ufc/g, ils doivent être réalisés conformément au Règlement (CE) N°2073/2005 (Annexe I, Chapitre 1, note 6), en étalant 1 ml sur 3 boîtes de Petri de 90 mm de diamètre ou sur 1 boîte de 140 mm de diamètre.

### **5.4.2. PRESENTATION DES RESULTATS**

Pour chaque lot, toutes les mesures obtenues à chaque point d'analyse doivent être fournies (éventuellement sous une forme graphique) ainsi que les *valeurs moyennes* pour chaque point d'analyse. Toutes les représentations graphiques et tous les calculs doivent être réalisés sur les données en logarithme base 10 du nombre d'ufc/g. Pour chaque lot, le potentiel de croissance est constitué de la différence entre le résultat le plus élevé en logarithme base 10 du dénombrement réalisé à la DLC et celui le plus bas du dénombrement réalisé au jour 0.

Le nombre de jours de conservation entre chaque point d'analyse et les potentiels de croissance correspondants doivent être clairement indiqués. Pour les tests au cours desquels plusieurs températures sont utilisées, le scénario thermique du challenge test doit être fourni sous la forme de graphe et/ou de tableau. L'intégralité des résultats obtenus doit être accessible. L'interprétation des résultats doit être confiée à un microbiologiste qualifié.

## 6. Modalités d'interprétation d'un challenge test

### 6.1. Protocole limité

Lors de la réalisation d'un challenge test limité dans le cas d'un aliment de catégorie 3.3, on peut obtenir les points de mesure suivants le jour 0 et en fin de conservation (DLC) :

#### Cas 1

lot	jour	concentration (ufc/g)	concentration (log <sub>10</sub> ufc/g)	potentiel de croissance DLC <sub>max</sub> - jour 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> ufc/g)
1	0	40	1,60	0,40
		60	1,78	
	DLC	100	2,00	
		20	1,30	
2	0	50	1,70	0,12
		30	1,48	
	DLC	30	1,48	
		40	1,60	

#### Cas 2

lot	jour	concentration (ufc/g)	concentration (log <sub>10</sub> ufc/g)	potentiel de croissance DLC <sub>max</sub> - jour 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> ufc/g)
1	0	50	1,70	0,38
		70	1,85	
	DLC	30	1,48	
		120	2,08	
2	0	40	1,60	0,40
		50	1,70	
	DLC	100	2,00	
		60	1,78	

Dans ces 2 exemples, la différence entre les dénombrements en fin de conservation par rapport au jour 0 n'est jamais supérieure à 0,5 unité log. Les changements dans les valeurs des dénombrements peuvent être imputables à l'incertitude de mesure de la détermination microbiologique, et non à la croissance/disparition du pathogène. Ces résultats confirment l'appartenance de l'aliment à la catégorie 3 et signifient qu'on peut utiliser le critère « < 100 ufc/g » dès la sortie de production et pendant toute la durée de conservation.

### Cas 3

lot	jour	concentration (ufc/g)	concentration (log <sub>10</sub> ufc/g)	potentiel de croissance DLC <sub>max</sub> - jour 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> ufc/g)
1	0	50	1,70	<b>0,52</b>
		30	1,48	
	DLC	80	1,90	
		100	2,00	
2	0	60	1,78	0,30
		70	1,85	
	DLC	80	1,90	
		120	2,08	

Dans ce cas, la différence pour le premier lot testé dépasse 0,5 unité log. Une croissance de *L. monocytogenes* est donc possible. De ce fait, l'aliment en cause doit être classé dans la catégorie 4, ce qui implique la réalisation d'un challenge test complet (cf ci-dessous).

### 6.2. Protocole complet

On trouvera ci-dessous une série d'exemples où 3 lots d'un aliment font l'objet d'un challenge test réalisé chaque fois en double (= sur 2 unités pour chaque lot). Ce qui signifie qu'au total, on obtient au minimum 6 valeurs de points de mesure le jour 0 et en fin de conservation. Dans le cas où un challenge test limité a déjà été réalisé, les valeurs obtenues peuvent être conservées pour le protocole complet.

### Cas 1

lot	jour	concentration (ufc/g)	concentration (log <sub>10</sub> ufc/g)	potentiel de croissance DLC <sub>max</sub> - jour 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> ufc/g)
1	0	30	1,48	1,28
		40	1,60	
	DLC	570	2,76	
		280	2,45	
2	0	50	1,70	<b>2,02</b>
		40	1,60	
	DLC	1300	3,11	
		4200	3,62	
3	0	30	1,48	1,48
		60	1,78	
	DLC	740	2,87	
		920	2,96	

Les résultats doivent être interprétés de la façon suivante :

- La différence maximale observée entre les dénombrements à la date limite de consommation et au jour 0 est de 2,02 unités log pour le lot 2.
- Le tableau III permet de déduire la valeur de tolérance au jour 0 à partir la différence la plus grande observée. Dans notre exemple, (différence observée maximale de 2,02 unités log), la valeur de tolérance est « absence dans 10 g ». L'utilisation de la différence observée maximale (au lieu de la moyenne) permet de tenir compte du « worst case scenario ».
- Lorsque, lors d'un contrôle par le fabricant ou par l'autorité compétente, on constate la présence de *L. monocytogenes* dans 10 g au jour 0, la valeur limite de 100 ufc/g risque d'être dépassée à la fin de la durée de conservation de la denrée alimentaire. La sécurité alimentaire de cette denrée ne peut donc être garantie.

Tableau III. Détermination de la valeur de tolérance le jour 0 en fonction de la plus grande différence observée entre la valeur obtenue à la DLC et celle du J0.

Différence la plus grande observée log <sub>10</sub> (ufc/g)	Valeur de tolérance le jour 0
Entre -1,00 et 0,00	Absence dans 0.01 g ou 100 cfu/g
Entre 0,00 et 0.99	Absence dans 0.1 g
Entre 1,00 et 1,99	Absence dans 1 g
Entre 2,00 et 2,99	Absence dans in 10 g
Au delà de 2,99	Absence dans 25 g

#### Cas 2

lot	jour	concentration (ufc/g)	concentration (log <sub>10</sub> ufc/g)	potentiel de croissance DLC <sub>max</sub> - jour 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> ufc/g)
1	0	30	1,48	1,28
		40	1,60	
	DLC	570 280	2,76 2,45	
2	0	50	1,70	1,51
		40	1,60	
	DLC	1300 420	3,11 2,62	
3	0	30	1,48	1,49
		60	1,78	
	DLC	740 920	2,87 2,96	

Les résultats peuvent être interprétés de la façon suivante :

- La différence observée maximale entre les dénombrements à la DLC et au jour 0 est de 1,51 unités log.
- Sur base du tableau III, on peut déduire une valeur de tolérance “absence de *L. monocytogenes* dans 1 g”.
- Lorsque, lors de contrôle par le fabricant ou l'autorité, on constate la présence de *L. monocytogenes* dans 1 g au jour 0, cela veut dire que la valeur limite de 100 ufc/g peut être dépassée à la fin de la durée de conservation de la denrée alimentaire et qu'il peut y avoir un problème de sécurité alimentaire.

### Cas 3

lot	jour	concentration (ufc/g)	concentration (log <sub>10</sub> ufc/g)	potentiel de croissance DLC <sub>max</sub> - jour 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> ufc/g)
1	0	30	1,48	<b>0,60</b>
		40	1,60	
	DLC	120	2,08	
		80	1,90	
2	0	50	1,70	0,18
		40	1,60	
	DLC	30	1,48	
		60	1,78	
3	0	30	1,48	0,47
		60	1,78	
	DLC	90	1,95	
		80	1,90	

Les résultats peuvent être interprétés de la façon suivante :

- La différence observée maximale entre les dénombrements à la date limite d'utilisation et au jour 0 est de 0,6 unités log.
- Sur base du tableau III, on peut déduire une valeur de tolérance “absence de *L. monocytogenes* dans 0,1 g”.
- Lorsque, lors de contrôle par le fabricant ou l'autorité, on constate la présence de *L. monocytogenes* dans 0,1 g au jour 0, cela veut dire que la valeur limite de 100 ufc/g peut être dépassée à la fin de la durée de conservation de la denrée alimentaire et qu'il peut y avoir un problème de sécurité alimentaire.

#### Cas 4

lot	jour	concentration (ufc/g)	concentration (log <sub>10</sub> ufc/g)	potentiel de croissance DLC <sub>max</sub> - jour 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> ufc/g)
1	0	40	1,60	<b>0,40</b>
		40	1,60	
	DLC	80	1,90	
		100	2,00	
2	0	50	1,70	0,25
		40	1,60	
	DLC	30	1,48	
		70	1,85	
3	0	30	1,48	0,22
		60	1,78	
	DLC	40	1,60	
		50	1,70	

Les résultats peuvent être interprétés de la façon suivante :

- La différence observée maximale entre les dénombrements à la date limite d'utilisation et au jour 0 est de 0,40 unités log.
- Sur base du tableau III, on peut déduire une valeur de tolérance "absence de *L. monocytogenes* dans 0,1 g".
- Lorsque, lors de contrôle par le fabricant ou l'autorité, on constate la présence de *L. monocytogenes* dans 0,1 g au jour 0, cela veut dire que la valeur limite de 100 ufc/g peut être dépassée à la fin de la durée de conservation de la denrée alimentaire et qu'il peut y avoir un problème de sécurité alimentaire.

En rapport avec ce dernier exemple, on peut relever que la différence observée maximale est du même ordre de grandeur que celui des exemples des challenge tests réduits pour les denrées de catégorie 3. Toutefois, ceci ne peut pas faire conclure qu'une denrée alimentaire de catégorie 4 peut être classée dans la catégorie 3 lorsque la différence observée maximale est suffisamment faible (voire négative). Contrairement aux denrées alimentaires de catégorie 4, il existe en effet, pour la catégorie 3, des données scientifiques publiées dont il ressort qu'il ne peut pas y avoir de multiplication.

#### Remarques

Si le fabricant trouve la valeur de tolérance déduite des challenge tests non réaliste, il peut choisir de garantir la sécurité alimentaire en fin de conservation en raccourcissant la durée de conservation de l'aliment ou en adaptant la formulation de l'aliment ou les conditions de conservation de manière à ce que la croissance de *L. monocytogenes* soit mieux maîtrisée. Dans ce cas-ci, de nouveaux challenge tests doivent être effectués afin de fixer une valeur de tolérance adaptée au jour 0 pour *L. monocytogenes*.

## 7. Annexes

Annexe 1: Croissance et survie de *Listeria monocytogenes*: mesures de prévention dans la chaîne alimentaire (F. Devlieghere, M. Uyttendaele, Laboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie en –conservering, Universiteit Gent)

## Annexe 2: Incertitude de mesure des déterminations microbiologiques quantitatives

Concernant les résultats de dénombrements microbiens dans les denrées alimentaires, on peut définir l'incertitude de mesure comme une grandeur qui indique la possible variation autour du résultat d'analyse. La détermination de l'incertitude de mesure est nécessaire pour les laboratoires accrédités, et elle est notamment utilisée pour établir si des mesures faites par des laboratoires différents sur le même échantillon sont comparables et si, lorsqu'on confronte le résultat de la mesure à une valeur limite, cette valeur limite est respectée avec une certaine certitude ou bien qu'elle est dépassée. En pratique, on admet souvent que l'incertitude de mesure d'une détermination microbiologique quantitative (comptage) est de  $\pm 0,5$  unité log (ceci a également été démontré expérimentalement sur base de la reproductibilité intralaboratoire à l'occasion du développement de la norme ISO TS 19036 concernant ce sujet). Cela signifie que, par ex. en cas d'un résultat d'analyse pour *L. monocytogenes* de 60 ufc/g (log 1.78), lors d'une nouvelle analyse on obtiendra en raison de l'incertitude de mesure un résultat se situant entre 1,28 et 2,28 unités log, soit entre 19 et 190 ufc/g. En pratique, cela signifie qu'on ne peut parler de croissance tant que 2 multiplications n'ont pas eu lieu (2 multiplications de *L. monocytogenes* en cas de 60 ufc/g signifierait en effet qu'on trouve une valeur de 60→120→240 ufc/g).

Une remarque importante est qu'il est précisé dans le projet de spécification technique ISO TS 19036 que celle-ci ne s'applique pas à la détermination de l'incertitude de mesure associée à de faibles concentrations de micro-organismes. Dans ce contexte, les "faibles concentrations" sont définies comme des concentrations résultant en moins de 10 colonies, dénombrées sur au moins 1 plaque de Pétri, ce qui correspond normalement à moins de 100 ou 1000 ufc/g ou ufc/ml de produit (voir la norme ISO 7218: Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations). En ce qui concerne les challenge tests décrits dans cet avis, il s'agit le plus souvent de faibles concentrations de micro-organismes (voir ci-dessus). Néanmoins, l'incertitude de mesure de 0,5 unité log reste en vigueur pour de l'interprétation des résultats des challenge tests pour les denrées alimentaires de catégorie 3, en attendant qu'une meilleure estimation de l'incertitude de mesure (ou une méthodologie pour faire cette estimation) pour les faibles concentrations soit disponible.

### Annexe 3: Organigramme de décision pour un aliment donné

