



Advies 09-2006 : Evaluatie van een protocol voor challenge testen voor *Listeria monocytogenes* (dossier Sci Com 2005/49)

Het Wetenschappelijk Comité van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen; overwegende de besprekingen tijdens de plenaire zittingen van 9 september en 9 december 2005 en van 20 januari en 10 februari 2006; geeft het volgende advies:

INLEIDING

Aan het Wetenschappelijk Comité van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) werd gevraagd om het document “*Avis concernant les challenge tests relatifs à Listeria monocytogenes*” te evalueren. Dit document werd op vraag van het FAVV opgesteld door het Nationaal Referentielaboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie, Departement Levensmiddelenwetenschappen – Microbiologie, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit van Luik. Het document zal door het FAVV gebruikt worden als leidraad voor de implementatie van een aantal bepalingen met betrekking tot *L. monocytogenes* uit Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van de Commissie inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen. Deze Verordening legt onder meer voedselveiligheidscriteria vast voor *L. monocytogenes* in kant-en-klare levensmiddelen (Bijlage I, Hoofdstuk 1).

Volgende voedselveiligheidscriteria gelden voor kant-en-klare levensmiddelen met uitzondering van zuigelingenvoeding en voeding voor medisch gebruik.

- Voor kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor *L. monocytogenes* kunnen dienen:
 1. een grenswaarde van 100 kve/g, voor de duur van de houdbaarheidstermijn, voor producten die in de handel zijn gebracht, of,
 2. de afwezigheid in 25 g, voordat het levensmiddel de directe controle van de exploitant van een levensmiddelenbedrijf die het geproduceerd heeft, heeft verlaten.

Het eerste criterium is van toepassing als de producent tot tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de grenswaarde van 100 kve/g zal voldoen. De exploitant kan intermediaire grenswaarden tijdens het proces vaststellen, die zo laag moeten zijn dat de grenswaarde van 100 kve/g aan het eind van de houdbaarheidstermijn niet wordt overschreden. Het tweede criterium geldt indien de exploitant niet tot tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de grenswaarde van 100 kve/g zal voldoen.

- Voor kant-en-klare levensmiddelen die niet als voedingsbodem voor *L. monocytogenes* kunnen dienen: een grenswaarde van 100 kve/g voor de duur van de houdbaarheidstermijn, voor producten die in de handel zijn gebracht.

Volgens artikel 3, punt 2 van de Verordening dienen exploitanten van levensmiddelenbedrijven studies uit te voeren om na te gaan of aan de criteria voldaan wordt gedurende de hele houdbaarheidstermijn van de levensmiddelen. Dit geldt in het bijzonder voor kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor *L. monocytogenes* kunnen dienen.

Het document dat voorligt voor advies geeft aan op welke manier deze studies door de fabrikanten kunnen uitgevoerd worden, met speciale aandacht voor de challenge testen die eventueel dienen uitgevoerd te worden. Het is gebaseerd op een advies van het *Agence française de sécurité sanitaire des aliments*, getiteld "*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)*". Het bestaat uit volgende onderdelen: (i) reglementaire basis, (ii) classificatie van levensmiddelen, (iii) definitie van een challenge test en (iv) protocol van een challenge test.

OPMERKINGEN EN AANBEVELINGEN

Algemeen meent het Wetenschappelijk Comité dat het document een goede basis vormt voor de implementatie van de vermelde bepalingen uit de Verordening met betrekking tot *L. monocytogenes*. Het document kan als leidraad gebruikt worden voor de fabrikanten om bovenvermelde studies uit te voeren en door inspecteurs/controleurs om deze studies te beoordelen. Er dient wel benadrukt te worden dat de in het document vermelde richtlijnen niet los te koppelen zijn van het autocontrolesysteem (HACCP) dat in een levensmiddelenbedrijf van toepassing is.

Punt 1 : « Reglementaire basis »

In dit gedeelte van het document worden de relevante artikelen uit de Verordening samengevat. Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat in dit gedeelte beter verwezen wordt naar de relevante artikelen uit de Verordening (of dat deze artikelen letterlijk worden overgenomen), aangezien in een samenvatting belangrijke nuances kunnen verloren gaan.

Punt 2 : « Classificatie van levensmiddelen »

In dit gedeelte van het document worden levensmiddelen opgedeeld in 3 categorieën op basis van het risico van *L. monocytogenes* dat deze levensmiddelen inhouden.

Voor categorie 2 worden een aantal karakteristieken opgesomd (bijv. betreffende pH, wateractiviteit). Het Wetenschappelijk Comité meent dat hier aangevuld moet worden dat ook levensmiddelen met een houdbaarheidstermijn korter dan 5 dagen tot deze categorie behoren, analoog aan Bijlage I, Hoofdstuk 1, categorie 1.3 en voetnoot 8 uit de Verordening. De in het document gebruikte benaming "stabiele levensmiddelen" voor categorie 2 kan dan wel niet meer toegepast worden.

De levensmiddelen gehakt vlees, vleesbereidingen op basis van gehakt vlees, met inbegrip van worstvlees en verse rauwe worst worden in het document uitgesloten van categorie 1, indien redelijkerwijs kan verondersteld worden dat deze gedeeltelijk of geheel rauw zullen geconsumeerd worden. Indien deze levensmiddelen een houdbaarheid hebben van minder dan 5 dagen, zouden deze levensmiddelen moeten opgenomen worden in categorie 2.

De specificatie "pH < 4,2" dient vervangen te worden door "pH < 4,4", analoog aan de Verordening (Bijlage I, Hoofdstuk 1, voetnoot 8) en aan pg. 1 van het document.

Het Wetenschappelijk Comité wenst te benadrukken dat de lijst van vermelde karakteristieken voor levensmiddelen van categorie 2 niet exhaustief is. In praktijk wordt een vermindering van uitgroei van *L. monocytogenes* veelal bekomen door een combinatie van factoren (bijv. verlaging van pH, wateractiviteit en temperatuur tot suboptimale waarden, eventueel nog verder gecombineerd met conserveermiddelen, zoals organische zuren, of gemodificeerde atmosfeerverpakking). In het document "Groei en overleving van *Listeria monocytogenes*: preventieve maatregelen in de voedselketen"¹ worden een aantal voorbeelden van combinaties gegeven waarbij *L. monocytogenes* niet kan uitgroeien.

Indien ingeschat wordt dat een levensmiddel tot categorie 2 behoort op basis van gepubliceerde wetenschappelijke gegevens (eventueel ondersteund aan de hand van voorspellende modellen), en indien dit levensmiddel niet voldoet aan de in het document (of in de Verordening of een andere reglementaire tekst) opgesomde karakteristieken van pH, wateractiviteit of invriezing/diepvriezing, raadt het Wetenschappelijk Comité een test aan om te verifiëren dat dit levensmiddel inderdaad geen groei van *L. monocytogenes* toelaat. Deze verificatietest bestaat uit een beperkte challenge test, waarbij het levensmiddel geïnoculeerd wordt met *L. monocytogenes* en waarbij op dag 0 en op het einde van de houdbaarheid de concentratie van *L. monocytogenes* wordt bepaald. Enkel indien geen groei wordt vastgesteld (rekening houdend met de meetonzekerheid van de kwantitatieve microbiologische bepaling), is categorie 2 van toepassing.

In de bijlage bij dit advies wordt meer achtergrond verstrekt met betrekking tot de meetonzekerheid van kwantitatieve microbiologische bepalingen (tellingen). Deze meetonzekerheid dient normaal gezien bepaald te worden door elk geaccrediteerd laboratorium dat de tellingen uitvoert. In praktijk wordt vaak aangenomen dat de meetonzekerheid van een microbiologische telling $\pm 0,5$ logeenheid bedraagt.

Bij de uitvoering van de beperkte challenge test gelden dezelfde richtlijnen als deze die verderop in het advies beschreven zijn in het kader van de (uitgebreidere) challenge testen voor levensmiddelen van categorie 3, voor wat betreft de keuze van de stammen, de voorbereiding van het inoculum en de inoculatie van het levensmiddel. Enkel het aantal testen is lager, aangezien voor de uitgebreidere challenge testen rekening gehouden wordt met de heterogeniteit binnen een lot en tussen loten van levensmiddelen. Om in de beperkte challenge test toch ook in zekere mate rekening te kunnen houden met de eventuele heterogeniteit tussen verschillende productloten, stelt het Wetenschappelijk Comité voor om de beperkte challenge test uit te voeren voor 2 eenheden uit 2 verschillende loten. Hierbij worden een aantal voorbeelden gegeven, met bijbehorende meetpunten op dag 0 en op het einde van de houdbaarheidsstermijn.

Voorbeeld 1

Dag 0		Einde houdbaarheidsstermijn (TGT ²)		TGT – Dag 0 (Verschil in log ₁₀)
kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	
40	1,60	100	2,00	0,40
60	1,78	20	1,30	-0,48

Voorbeeld 2

¹ F. Devlieghere, M. Uyttendaele, Laboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie en – conservering, Universiteit Gent.

² TGT: "Te gebruiken tot" houdbaarheidsdatum.

Dag 0		Einde houdbaarheidstermijn (TGT)		TGT – Dag 0 (Verschil in log ₁₀)
kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	
50	1,70	30	1,48	- 0,22
70	1,85	120	2,08	0,23

Voorbeeld 3

Dag 0		Einde houdbaarheidstermijn (TGT)		TGT – Dag 0 (Verschil in log ₁₀)
kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	
30	1,48	40	1,60	0,12
50	1,70	60	1,78	0,08

In deze 3 voorbeelden bedraagt het verschil tussen de tellingen op het einde van de houdbaarheidstermijn en op dag 0 nooit meer dan een 0,5 logeenheid. Wijzigingen in de waarden van de tellingen zijn waarschijnlijk toe te schrijven aan de meetonzekerheid van de microbiologische bepaling en niet aan de groei/afsterving van de pathoëen.

Opmerking

Tellingen van *L. monocytogenes* in de grootte-orde van 10-100 kve/g dienen overeenkomstig de Verordening (bijlage I, hoofdstuk 1, voetnoot 6) te gebeuren door 1 ml uit te strijken over 3 petriplaten van 90 mm diameter of 1 petriplaat van 140 mm diameter.

Punt 3 : « Definitie van een challenge test » (voor levensmiddelen van categorie 3)

In dit gedeelte van het document wordt een definitie van een challenge test gegeven, zoals deze zal moeten uitgevoerd worden voor levensmiddelen van categorie 3, wanneer de fabrikant de grenswaarde van 100 kve/g, gedurende de hele houdbaarheidstermijn van het levensmiddel, wenst toe te passen (Verordening, Bijlage I, Hoofdstuk 1, categorie 1.2). Het Wetenschappelijk Comité wil hierbij opmerken dat, indien gekozen wordt voor deze grenswaarde (in plaats van afwezigheid in 25 g), de streefwaarde op dag 0 (op de dag van productie) nog steeds afwezigheid in 25 g dient te zijn, omwille van het algemeen principe dat pathogenen zo veel mogelijk dienen afwezig te zijn in de voedselketen. De Verordening (Bijlage I, Hoofdstuk 1, categorie 1.2, voetnoot 5) geeft aan dat, indien *L. monocytogenes* dan toch accidenteel aanwezig is, de tolerantiewaarde op de dag van productie kan aangepast worden zodat steeds de door de Verordening opgelegde grenswaarde van 100 kve/g wordt gerespecteerd op de uiterste datum van consumptie. De tolerantiewaarde op de dag van productie is afhankelijk van het potentieel van *L. monocytogenes* om zich te vermenigvuldigen in het betreffende levensmiddel met de voorgeschreven bewaarcondities binnen de voorgeschreven houdbaarheidstermijn. Deze groei kan onder andere door middel van challenge testen (waarbij de pathoëen artificieel geïnoculeerd wordt in/op het levensmiddel) gekwantificeerd worden. Dit wordt bij voorkeur tevens onderbouwd aan de hand van wetenschappelijke literatuur of voorspellende modellen. Indien het groeipotentieel van *L. monocytogenes* niet kan onderbouwd worden door de fabrikant, dient de grenswaarde "afwezig in 25 g" gebruikt te worden.

In tegenstelling tot de beperkte challenge test voor levensmiddelen van categorie 2, die enkel bedoeld is als een extra bevestiging (naast gepubliceerde wetenschappelijke gegevens, eventueel ondersteund aan de hand van voorspellende modellen) dat geen groei

van *L. monocytogenes* kan plaatsvinden, heeft de challenge test voor levensmiddelen van categorie 3 tot doel een inschatting te maken van het groeipotentieel.

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat ook in het geval van categorie 3 een challenge test met twee punten, namelijk op dag 0 (dag productie) en op het einde van de houdbaarheidstermijn (TGT), volstaat voor de beoogde doelstelling: het groeipotentieel inschatten van *L. monocytogenes* in het desbetreffende levensmiddel tijdens de voorgeschreven bewaarcondities en het daaruit afleiden van de tolerantiewaarde op dag 0 voor *L. monocytogenes* door de fabrikant. Het is deze tolerantiewaarde die de basis zal zijn enerzijds voor de fabrikant om controles uit te voeren in het kader van de verificatie van het HACCP-systeem (autocontrole) en anderzijds voor de overheid om het naleven van het criterium in de Verordening (Bijlage I, Hoofdstuk 1, categorie 1.2) te controleren. Het uitvoeren van een challenge test met meer dan 2 meetpunten kan eventueel interessante informatie opleveren voor de fabrikant, maar is niet strikt noodzakelijk voor het bepalen van de tolerantiewaarde, daar hierbij toch enkel de meetpunten op dag 0 en op het einde van de houdbaarheidstermijn zullen in rekening gebracht worden. Voor het bekomen van een volwaardige groeicurve zijn minimum 10 meetpunten nodig om op betrouwbare wijze de lagfase en de groeisnelheid te kunnen afleiden³.

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat, in tegenstelling tot levensmiddelen van categorie 2 (waar het uitvoeren van een beperkte challenge test volstaat ter verificatie van literatuurkennis, voorspellende modellen, etc.), in het geval van categorie 3 deze beperkte challenge test meerdere malen dient herhaald te worden om bij het stellen van de tolerantiewaarde op dag 0 in voldoende mate rekening te kunnen houden met de heterogeniteit van het levensmiddel en de productieketen (zie punt 4.3.2 en 4.3.3).

Punt 4 : « Protocol van een challenge test » (voor levensmiddelen van categorie 3)

In dit gedeelte van het document wordt uitgelegd op welke manier een challenge test dient uitgevoerd te worden.

Het productieproces van het desbetreffende levensmiddel dient beknopt beschreven te worden (punt 4.1.1). Deze beschrijving kan normaal gezien afgeleid worden van het HACCP-systeem dat beschikbaar moet zijn in het bedrijf.

Naast de in punt 4.1.2 vermelde karakteristieken betreffende het levensmiddel zou expliciet moeten vermeld worden wat het te verwachten tijd/temperatuursprofiel is dat het levensmiddel doorloopt. Dit zijn de tijd/temperatuurscombinaties (die naar men verwacht worden gerespecteerd) tijdens de interne opslag in het bedrijf, tijdens het transport, tijdens de eventuele tussenopslag in het distributiecentrum, tijdens de uitstalling in koeltoonbanken in de detailhandel en tijdens bewaring bij de consument. Tevens dient duidelijk de maximale termijn van houdbaarheid aangegeven te worden.

Met betrekking tot de keuze van de stammen voor de challenge test, beschreven in punt 4.2.1, moet opgemerkt worden dat het niet altijd mogelijk is om een stam te isoleren uit het levensmiddel in kwestie. Indien wel een stam kan geïsoleerd worden, is een juiste identificatie van deze stam noodzakelijk. Het Wetenschappelijk Comité raadt aan om bij voorkeur gebruik te maken van voedselisolaten die goed geïdentificeerd zijn en goed gekarakteriseerd zijn met betrekking tot groei-eigenschappen en morfologie. Verder is het Wetenschappelijk Comité van mening dat het niet nodig is om de twee geselecteerde stammen apart te bestuderen. Beide stammen mogen na het opkweken gemengd worden

³ Walker S.J. and Jones J.E. (1993). Protocols for data generation for predictive modelling. J. Industrial Microbiology, 12, 273-276

voorafgaand aan de inoculatie in/op het desbetreffende levensmiddel. Het is immers niet nodig om voor beide stammen afzonderlijk na te gaan of zij kunnen groeien in/op het levensmiddel in kwestie.

Bij de voorbereiding van het inoculum (punt 4.2.2) zou moeten gespecificeerd worden dat het initiële aantal cellen in het levensmiddel hoog genoeg moet zijn om effecten van variabiliteit in groei omwille van lage inoculumniveaus te beperken. Individuele cellen vertonen namelijk een grote variabiliteit met betrekking tot de lengte van de lagfase⁴. Het geënte aantal cellen dient gelijk te zijn aan 100 à 1000 cellen per portie levensmiddel dat gebruikt wordt in de challenge test. Het enten van te hoge aantallen *L. monocytogenes* is ook niet aanbevolen omdat dit weinig realistisch is voor de aangetroffen contaminatieniveaus bij natuurlijk besmette levensmiddelen en omdat de competitieve flora dan eventueel wordt onderdrukt en vaak een overschatting van het groeipotentieel wordt bekomen. Het is aanbevolen een inoculumniveau te kiezen dat realistisch is en waarbij toch telbare aantallen bekomen worden (i.e. minimum 10 kve/g). Om een initiële concentratie lager dan 100 kve/g te bekomen, zoals vermeld in het document, dient de grootte van de portie van het levensmiddel dus goed gekozen te worden. Verder moet zowel vóór als onmiddellijk na het inoculeren de concentratie van *L. monocytogenes* van het levensmiddel bepaald worden, aangezien er reeds *L. monocytogenes* cellen aanwezig kunnen zijn in het levensmiddel vóór de inoculatie. Ook van het inoculum wordt best de celconcentratie bepaald. Het Wetenschappelijk Comité betwijfelt of de richtlijn in het document voor het kiezen van de temperatuur waarbij de precultuur wordt opgekweekt voldoende werkbaar is. Bij een eerder lagere temperatuur weet men heden vaak niet precies in welk tijdbestek de precultuur zal uitgroeien en tot welk niveau, wat de planning en de uitvoering van de challenge test bemoeilijkt. De opkweektemperatuur wordt best zo gekozen dat een gestandaardiseerde precultuur van cellen in de stationaire fase wordt bekomen, waarmee de beoogde initiële concentratie (kve/g) gemakkelijk kan gerealiseerd worden.

Bij de beschrijving van de inoculatie van het levensmiddel (punt 4.2.3) wordt gespecificeerd dat eventueel meerdere inoculaties noodzakelijk zijn. Het is aangewezen aan te geven dat het inoculaties vanuit hetzelfde inoculum op verschillende plaatsen van het levensmiddel betreft (met het oog op het verdelen van het inoculum over de volledige massa/volume/oppervlakte van het levensmiddel) en hierbij een aantal voorbeelden te geven: een inoculatie in en op het levensmiddel simuleert een besmetting van levensmiddelen die bereid worden door menging van verschillende grondstoffen (bijv. een slaatje), terwijl een inoculatie van het oppervlak van het levensmiddel een nabesmetting simuleert (bijv. pâté). De zin "pour le cas d'un produit cuit, l'inoculation peut être réalisée sur une matrice sterile pour simuler une recontamination après traitement technique" zou beter geschrapt worden, aangezien het niet de bedoeling is dat het levensmiddel werkelijk gesteriliseerd wordt maar dat een representatief levensmiddel met aanwezigheid van een representatieve begeleidende flora wordt beënt.

Indien de challenge test niet bij constante temperatuur uitgevoerd wordt, maar bij een tijd/temperatuursprofiel (punt 4.3.1), is het aangewezen om dit profiel te standaardiseren. Aangezien hier momenteel geen internationale norm voor bestaat (bijv. ISO), stelt het Wetenschappelijk Comité voor om voorlopig het profiel zo te kiezen dat het levensmiddel gedurende 1/3 van de tijd van de challenge test bij een temperatuur T_1 geïncubeerd wordt en gedurende 2/3 van de tijd bij een temperatuur T_2 , waarbij T_1 de temperatuur bij de fabrikant (interne opslag) of de wettelijke bewaartemperatuur voorstelt en T_2 de gemiddelde

⁴ 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.

temperatuur van een huishoudkoelkast in België (deze laatste kan bijv. geschat worden op basis van gegevens uit de voedselconsumptiepeiling).

Wat het aantal analyses per lot van het levensmiddel betreft (punt 4.3.2), lijken minimum drie herhalingen per analysepunt van de challenge test overbodig. Deze herhalingen leveren immers vooral informatie met betrekking tot de meetonzekerheid, die goed beheerst zou moeten zijn in geaccrediteerde laboratoria. Het is wel belangrijk om voldoende rekening te houden met de eventuele heterogeniteit binnen een lot. Het Wetenschappelijk Comité stelt daarom voor dat minimum twee eenheden per lot getest worden. Dit wil zeggen dat aanbevolen wordt om de challenge test per lot in duplo uit te voeren (twee eenheden enten per lot en analyseren op dag 0 en op het einde van de houdbaarheidstermijn (TGT)).

Wat het aantal te testen loten betreft (punt 4.3.3) stelt het Wetenschappelijk Comité voor dat minimum drie loten getest worden.

Het aantal challenge testen kan verhoogd worden in functie van de graad van heterogeniteit binnen een lot en tussen loten, de mate waarin het lot al dan niet een "worst case scenario" van het levensmiddel voorstelt, de veiligheidsmarge met betrekking tot de bepaalde tolerantiewaarde op dag 0 en de mate van de uitwerking en verificatie van het HACCP-systeem binnen het bedrijf (zie verder: voorbeelden).

Tenslotte dient voldoende aandacht besteed te worden aan de interpretatie van de resultaten van de challenge test (punt 4.4.2). Ideaal gezien zou bij de interpretatie rekening moeten gehouden worden met de meetonzekerheid. Momenteel is echter nog geen duidelijkheid op Europees niveau omtrent het omgaan met de meetonzekerheid bij de interpretatie van microbiologische testresultaten. In afwachting van een Europese consensus worden hierbij een aantal voorbeelden gegeven waarbij een eerder praktische wijze van interpretatie wordt toegepast (zonder dat echt met de meetonzekerheid rekening wordt gehouden). Deze werkwijze bestaat erin dat het grootste geobserveerde groeipotentieel dat bij de verschillende testen wordt geobserveerd (wat eigenlijk een "worst case" scenario reflecteert) in rekening wordt gebracht bij het stellen van de tolerantiewaarde op dag 0. Het is aangewezen dat deze praktische wijze van interpretatie wordt aangepast zodra er Europese richtlijnen omtrent het hanteren van meetonzekerheid bij microbiologische testresultaten beschikbaar zijn.

In de voorbeelden wordt telkens op 3 loten van een levensmiddel een challenge test uitgevoerd in duplo (dus op 2 eenheden per lot). Dit betekent dat in totaal 6 waarden worden bekomen van meetpunten op dag 0 en op het einde van de houdbaarheidstermijn.

Voorbeeld 1

Dag 0		Einde houdbaarheidstermijn (TGT)		TGT – Dag 0 (Verschil in log ₁₀)
kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	
30	1,48	570	2,76	1,28
40	1,60	280	2,45	0,85
50	1,70	1300	3,11	1,41
40	1,60	4200	3,62	2,02
30	1,48	740	2,87	1,39
60	1,78	920	2,96	1,18

De resultaten kunnen als volgt geïnterpreteerd worden.

- Het grootste geobserveerde verschil tussen de tellingen op TGT en op dag 0 is gelijk aan 2,02 logeenheden.

- Om de tolerantiewaarde op dag 0 af te leiden kan gebruik gemaakt worden van Tabel 1. In deze tabel wordt aangegeven hoe een geschikte tolerantiewaarde op dag 0 kan bepaald worden in functie van het grootste geobserveerde verschil. In het huidige voorbeeld (grootste geobserveerde verschil gelijk aan 2,02 logeenheden) is de tolerantiewaarde “afwezigheid van *L. monocytogenes* in 10 g”. Het valt op te merken dat het gebruik van het grootste geobserveerde verschil (in plaats van bijv. het gemiddelde) eigenlijk inhoudt dat rekening gehouden wordt met een soort van “worst case scenario”.
- Indien bij controle door de fabrikant of door de overheid aanwezigheid van *L. monocytogenes* in 10 g wordt vastgesteld op dag 0 betekent dit dat de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel kan overschreden worden en dat zich mogelijk een probleem stelt met betrekking tot de voedselveiligheid.

Tabel 1: Bepaling van de tolerantiewaarde op dag 0 in functie van het grootste geobserveerde verschil.

Grootste geobserveerde verschil $\log_{10}(\text{kve/g})$	Tolerantiewaarde op dag 0
Tussen -1,00 en 0,00	Afwezigheid in 0.01 g
Tussen 0,00 en 0,99	Afwezigheid in 0.1 g
Tussen 1,00 en 1,99	Afwezigheid in 1 g
Tussen 2,00 en 2,99	Afwezigheid in 10 g

Voorbeeld 2

(Enkel de vierde challenge test geeft op TGT een ander resultaat dan in voorbeeld 1.)

Dag 0		Einde houdbaarheid (TGT)		TGT – Dag 0 (Verschil in \log_{10})
kve/g	$\log_{10}(\text{kve/g})$	kve/g	$\log_{10}(\text{kve/g})$	
30	1,48	570	2,76	1,28
40	1,60	280	2,45	0,85
50	1,70	1300	3,11	1,41
40	1,60	420	2,62	1,02
30	1,48	740	2,87	1,39
60	1,78	920	2,96	1,18

Voor dit voorbeeld wordt op dezelfde manier tewerk gegaan als in voorbeeld 1.

- Het grootste geobserveerde verschil tussen de tellingen op TGT en op dag 0 is gelijk aan 1,41 logeenheden.
- Op basis van Tabel 1 kan een tolerantiewaarde van “afwezigheid van *L. monocytogenes* in 1 g” afgeleid worden.
- Indien bij controle door de fabrikant of door de overheid aanwezigheid van *L. monocytogenes* in 1 g wordt vastgesteld op dag 0 betekent dit dat de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel kan overschreden worden en dat zich mogelijk een probleem stelt met betrekking tot de voedselveiligheid.

Voorbeeld 3

Dag 0		Einde houdbaarheid (TGT)		TGT – Dag 0 (Verschil in \log_{10})
kve/g	$\log_{10}(\text{kve/g})$	kve/g	$\log_{10}(\text{kve/g})$	

30	1,48	120	2,08	0,60
40	1,60	80	1,90	0,30
50	1,70	30	1,48	- 0,22
40	1,60	60	1,78	0,18
30	1,48	90	1,95	0,47
60	1,78	80	1,90	0,12

Voor dit voorbeeld wordt op dezelfde manier tewerk gegaan als in voorbeeld 1.

- Het grootste geobserveerde verschil tussen de tellingen op TGT en op dag 0 is gelijk aan 0,60 logeenheden.
- Op basis van Tabel 1 kan een tolerantiewaarde van “afwezigheid van *L. monocytogenes* in 0,1 g” afgeleid worden.
- Indien bij controle door de fabrikant of door de overheid aanwezigheid van *L. monocytogenes* in 0,1 g wordt vastgesteld op dag 0 betekent dit dat de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel kan overschreden worden en dat zich mogelijk een probleem stelt met betrekking tot de voedselveiligheid.

Voorbeeld 4

Dag 0		Einde houdbaarheid (TGT)		TGT – Dag 0 (Verschil in log ₁₀)
kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	kve/g	Log ₁₀ (kve/g)	
30	1,48	80	1,90	0,42
40	1,60	100	2,00	0,40
50	1,70	30	1,48	- 0,22
40	1,60	70	1,85	0,25
30	1,48	40	1,60	0,12
60	1,78	50	1,70	-0,08

Voor dit voorbeeld wordt op dezelfde manier tewerk gegaan als in voorbeeld 1.

- Het grootste geobserveerde verschil tussen de tellingen op TGT en op dag 0 is gelijk aan 0,42 logeenheden.
- Op basis van Tabel 1 kan een tolerantiewaarde van “afwezigheid van *L. monocytogenes* in 0,1 g” afgeleid worden.
- Indien bij controle door de fabrikant of door de overheid aanwezigheid van *L. monocytogenes* in 0,1 g wordt vastgesteld op dag 0 betekent dit dat de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel kan overschreden worden en dat zich mogelijk een probleem stelt met betrekking tot de voedselveiligheid.

Bij dit laatste voorbeeld kan opgemerkt worden dat het grootste geobserveerde verschil van dezelfde grootte-orde is als deze van de voorbeelden van de beperkte challenge testen voor levensmiddelen van categorie 2. Toch mag hieruit niet geconcludeerd worden dat een levensmiddel van categorie 3 mag verplaatst worden naar categorie 2 indien het grootste geobserveerde verschil klein genoeg is (of zelfs negatief is). In tegenstelling tot levensmiddelen van categorie 3 zijn voor deze van categorie 2 immers gepubliceerde wetenschappelijke gegevens voorhanden die aantonen dat geen groei kan plaatsvinden.

Opmerking

Indien de fabrikant de van de challenge testen afgeleide tolerantiewaarde niet haalbaar acht kan hij opteren om de voedselveiligheid op het einde van de houdbaarheidstermijn te garanderen door deze houdbaarheidstermijn in te korten of de formulatie van het levensmiddel of de bewaarcondities aan te passen zodat de groei van *L. monocytogenes*

beter wordt geïnhibeerd. In dit geval dienen echter nieuwe challenge testen uitgevoerd te worden om aldus een aangepaste tolerantiewaarde op dag 0 voor *L. monocytogenes* te bepalen.

Voor het Wetenschappelijk Comité,
Prof. A. Huyghebaert,
Voorzitter
Brussel, 24 februari 2006

Bijlage: meetonzekerheid van kwantitatieve microbiologische bepalingen

Bij analyseresultaten van kwantitatieve microbiologische bepalingen in levensmiddelen kan de meetonzekerheid gedefinieerd worden als een parameter die de mogelijke spreiding rond het analyseresultaat aangeeft. Het bepalen van de meetonzekerheid is noodzakelijk voor geaccrediteerde laboratoria en wordt onder andere gebruikt om vast te stellen of metingen door verschillende laboratoria op hetzelfde staal vergelijkbaar zijn en, of bij toetsing van het meetresultaat aan een grenswaarde, met een bepaalde zekerheid aan de grenswaarde wordt voldaan, dan wel dat deze overschreden wordt. In praktijk wordt vaak aangenomen dat de meetonzekerheid van een kwantitatieve microbiologische bepaling (telling) $\pm 0,5$ logeenheid bedraagt. Dit is tevens proefondervindelijk aangetoond op basis van de intralaboratoriumreproduceerbaarheid naar aanleiding van de ontwikkeling van de technische specificatie ISO TS 19036 (*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*). Dit betekent dat bijv. in geval van een analyseresultaat voor *L. monocytogenes* van 60 kve/g (log 1.78) omwille van de meetonzekerheid bij heranalyse een resultaat zal bekomen worden dat gesitueerd is tussen 1,28 en 2,28 logeenheden (d.i. tussen 19 en 190 kve/g). Eveneens betekent dit dat er geen aantoonbare groei is zolang er geen 2 vermenigvuldigingen hebben plaatsgevonden (2 vermenigvuldigingen van *L. monocytogenes* in geval van 60 kve/g zou immers betekenen dat een waarde wordt aangetroffen van (60→120→) 240 kve/g).

Een belangrijke opmerking is dat in de ontwerp technische specificatie ISO TS 19036 vermeld wordt dat deze niet geldig is voor de bepaling van de meetonzekerheid die geassocieerd is met lage concentraties van micro-organismen. "Lage concentraties" worden hierbij omschreven als concentraties die resulteren in minder dan 10 kolonies, geteld op ten minste 1 petriplaat, wat normaal gezien overeenkomt met minder dan 100 of 1000 kve/g of kve/ml product (zie norm ISO 7218: *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rule for microbiological examinations*). Met betrekking tot de challenge testen die in dit advies beschreven worden, wordt veelal gewerkt met lage concentraties van micro-organismen (zie boven). Toch raadt het Wetenschappelijk Comité aan om bij de interpretatie van de resultaten van de challenge testen voor levensmiddelen van categorie 2 voorlopig uit te gaan van bovenvermelde meetonzekerheid van 0,5 logeenheid (zoals hierboven ook aangegeven), aangezien momenteel geen betere schatting van de meetonzekerheid (of methodologie voor deze schatting) voor lage concentraties beschikbaar is.