



Avis 09-2006: Evaluation d'un protocole pour les challenge tests relatifs à *Listeria monocytogenes* (dossier Sci Com 2005/49)

Le Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, considérant les discussions menées lors des séances plénières des 9 septembre et 9 décembre 2005 et des 20 janvier et 10 février 2006 ; émet l'avis suivant :

INTRODUCTION

Il a été demandé au Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) d'évaluer le document « *Avis concernant les challenge tests relatifs à Listeria monocytogenes* ». Ce document a été établi par le Laboratoire national de référence en microbiologie des denrées alimentaires, Département des sciences des denrées alimentaires – Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, à la demande de l'AFSCA. Le document sera utilisé par l'AFSCA comme guide pour la mise en œuvre d'un certain nombre de dispositions relatives à *L. monocytogenes* tirées du Règlement (CE) N° 2073/2005 de la Commission européenne concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Ce Règlement fixe, entre autres, des critères de sécurité alimentaire pour *L. monocytogenes* dans les denrées alimentaires prêtes à être consommées (Annexe I, Chapitre 1).

Les critères de sécurité alimentaire suivants sont applicables aux denrées alimentaires prêtes à être consommées, autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales.

- Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de *L. monocytogenes* :
 1. une limite de 100 ufc/g pour les produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation, ou,
 2. l'absence dans 25 g, avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriquée.

Le premier critère est applicable lorsque le fabricant est en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant la durée de conservation. L'exploitant peut fixer, pendant le procédé, des valeurs intermédiaires suffisamment basses pour garantir que la limite de 100 ufc/g ne sera pas dépassée au terme de la durée de conservation. Le deuxième critère est applicable lorsque le fabricant n'est pas en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant la durée de conservation.

- Denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes* : une limite de 100 ufc/g pour les produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation.

Selon l'article 3, point 2 du Règlement, les exploitants du secteur alimentaire doivent conduire des études afin d'examiner si les critères sont respectés pendant toute la durée de conservation des aliments. Ceci s'applique notamment pour les denrées prêtes à être consommées permettant le développement de *L. monocytogenes*.

Le document présenté pour avis indique de quelle manière ces études peuvent être effectuées par les fabricants, et s'attache spécialement aux challenge tests qui doivent éventuellement être réalisés. Il est basé sur un avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, intitulé « 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) ». Le document comporte les parties suivantes : (i) base réglementaire, (ii) classification des denrées alimentaires, (iii) définition d'un challenge test et (iv) protocole d'un challenge test.

REMARQUES ET RECOMMANDATIONS

De manière générale, le Comité scientifique estime que le document constitue une bonne base pour la mise en œuvre des dispositions du Règlement concernant *L. monocytogenes*. Le document peut être utilisé comme guide par les fabricants pour effectuer les études susmentionnées, et par les inspecteurs/contrôleurs 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.

Point 1 : « Base réglementaire »

Cette partie du document résume les articles pertinents du Règlement. Le Comité scientifique estime qu'il serait préférable de faire référence aux articles pertinents du Règlement (ou de les reprendre littéralement), étant donné que, dans un résumé, des nuances importantes peuvent être perdues.

Point 2 : « Classification des denrées alimentaires »

Dans cette partie du document, les denrées alimentaires sont classées en 3 catégories sur base du risque qu'elles impliquent concernant *L. monocytogenes*.

Pour la catégorie 2, une série de caractéristiques sont énumérées (par ex. concernant le pH, l'activité de l'eau). Le Comité scientifique estime qu'il faudrait compléter en disant que les denrées alimentaires avec une durée de conservation de moins de 5 jours font également partie de cette catégorie, de façon analogue à l'Annexe I, Chapitre 1, catégorie 1.3 et note de bas de page 8 du Règlement. Dès lors, l'appellation "aliments stables" utilisée dans le document pour la catégorie 2 ne peut plus être appliquée.

Les aliments viandes hachées, préparations de viandes obtenues à partir de viandes hachées, y compris les chairs à saucisse et les saucisses crues sont exclues de la catégorie 1 dans le document, s'il est raisonnablement prévisible qu'elles seront consommées partiellement ou totalement crues. Si elles ont une durée de conservation de moins de 5 jours, ces denrées alimentaires doivent être reprises dans la catégorie 2.

La spécification « pH < 4,2 » doit être remplacée par « pH < 4,4 », par analogie au Règlement (Annexe I, Chapitre 1, note de bas de page 8) et la page 1 du document.

Le Comité scientifique souligne que la liste des caractéristiques mentionnées pour les denrées alimentaires de catégorie 2 n'est pas exhaustive. 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 à des valeurs sous-optimales, éventuellement combiné à l'utilisation d'agents conservateurs comme des acides organiques, ou d'un emballage sous atmosphère modifiée). Dans le document « Groei en overleving van *Listeria monocytogenes*: preventieve maatregelen in de voedselketen »¹, un certain nombre d'exemples de combinaisons empêchant le développement de *L. monocytogenes* sont donnés.

Si on estime qu'un aliment fait partie de la catégorie 2 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 le document (ou dans le Règlement ou dans un autre texte réglementaire) en matière de pH, d'activité de l'eau ou de congélation/surgélation, le Comité scientifique conseille de faire un test pour vérifier si cet aliment ne permet pas, en effet, le développement de *L. monocytogenes*. Ce test de vérification consiste en un 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 2 est d'application.

L'annexe de cet avis donne de plus amples informations générales sur l'incertitude de mesure des déterminations microbiologiques quantitatives (dénombrements). Normalement, cette incertitude de mesure doit être déterminée par chaque laboratoire accrédité qui effectue les dénombrements. Sur le terrain, on présume souvent que l'incertitude de mesure d'un dénombrement microbiologique est de $\pm 0,5$ unités log.

Pour la réalisation du test de croissance (challenge test) réduit, les mêmes instructions que celles décrites plus loin dans l'avis dans le cadre des tests de croissance (plus étendus) pour les denrées alimentaires de catégorie 3, pour ce qui est du choix des souches, de la préparation de l'inoculum et de l'inoculation de la denrée alimentaire, sont d'application. C'est seulement le nombre de tests qui est moins élevé, vu que pour les tests de croissance plus étendus, on tient compte de l'hétérogénéité à l'intérieur d'un seul lot ainsi qu'entre plusieurs lots de denrées alimentaires. Afin de pouvoir tenir compte dans une certaine mesure de l'éventuelle hétérogénéité entre les différents lots de produits au niveau du test de croissance réduit, le Comité Scientifique propose de faire le test de croissance réduit sur 2 unités de 2 lots différents. On donne un certain nombre d'exemples avec les points d'analyse y afférents au jour 0 et à la fin de la durée de conservation du produit.

Exemple 1

Jour 0		Fin de conservation (DLC ²)		DLC – Jour 0 (Différence en log ₁₀)
ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	
40	1,60	100	2,00	0,40
60	1,78	20	1,30	-0,48

Exemple 2

Jour 0		Fin de conservation (DLC)		DLC – Jour 0 (Différence en log ₁₀)
ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	
50	1,70	30	1,48	- 0,22
70	1,85	120	2,08	0,23

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

² Date de limite de conservation

Exemple 3

Jour 0		Fin de conservation (DLC)		DLC – Jour 0 (Différence en log ₁₀)
ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	
30	1,48	40	1,60	0,12
50	1,70	60	1,78	0,08

Dans ces 3 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 sont probablement imputables à l'incertitude de mesure de la détermination microbiologique, et non à la croissance / disparition du pathogène.

Remarque

Les dénombrements de *L. monocytogenes* de l'ordre de 10-100 ufc/g doivent se faire conformément au Règlement (annexe I, chapitre 1, note 6), en étalant 1 ml dans 3 boîtes de Petri de 90 mm de diamètre ou dans 1 boîte de Petri de 140 mm de diamètre.

Point 3 : « Définition d'un challenge test » (pour les denrées alimentaires de la catégorie 3)

Dans cette partie du document, on donne une définition d'un challenge test tel qu'il devra être effectué pour les aliments de la catégorie 3 lorsque le fabricant souhaite appliquer la limite de 100 ufc/g pendant toute la durée de vie microbiologique de l'aliment (Règlement, Annexe I, Chapitre 1, catégorie 1.2). Le Comité scientifique voudrait faire remarquer à ce propos que si on opte pour ce critère (au lieu de celui de l'absence dans 25 g), la valeur à atteindre le jour 0 (le jour de production) doit toujours être l'absence dans 25 g, vu le principe général selon lequel les pathogènes doivent autant que possible être absents de la chaîne alimentaire. Le Règlement (Annexe I, Chapitre 1, catégorie 1.2, note 5) indique que si *L. monocytogenes* est quand même présente par accident, la valeur de tolérance le jour de production peut être adaptée de telle façon que la limite de 100/g proposée dans le Règlement soit toujours respectée à la date limite de consommation. La valeur de tolérance le jour de production dépend du potentiel de *L. monocytogenes* à se multiplier dans l'aliment en question avec les conditions de conservation prescrites dans le délai de conservation prescrit. Cette croissance peut être notamment quantifiée au moyen de challenge tests (où le pathogène est artificiellement inoculé dans/sur l'aliment). Ceci doit de préférence être étayé via 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 la valeur de tolérance « absent dans 25 g ».

Contrairement au challenge test réduit pour les denrées alimentaires de catégorie 2 dont le but unique est d'apporter une confirmation supplémentaire (en plus des données scientifiques publiées, éventuellement avec modèles prévisionnels à l'appui) que la multiplication de *L. monocytogenes* n'est pas possible, le challenge test pour les denrées alimentaires de catégorie 3 a pour but de faire une estimation du potentiel de multiplication.

Le Comité scientifique estime que, même dans le cas de la catégorie 3, un challenge test à deux points de mesure, en l'occurrence le jour 0 (jour de production) et à la fin de la conservation (DLC) suffit pour l'objectif visé, qui est d'estimer le potentiel de croissance de *L. monocytogenes* dans l'aliment en question pendant les conditions de conservation prescrites, et d'en déduire la valeur de tolérance le jour 0 pour *L. monocytogenes* par le fabricant. C'est cette valeur de tolérance qui servira de base, d'une part au fabricant pour effectuer les contrôles dans le cadre de la vérification du système HACCP (autocontrôle), et

d'autre part à l'autorité pour contrôler le respect du critère du Règlement (Annexe I, Chapitre 1, catégorie 1.2). La réalisation d'un challenge test à plus de 2 points de mesure peut fournir des informations éventuellement intéressantes au 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. Pour obtenir une véritable courbe de croissance, un minimum de 10 points de mesure sont nécessaires pour pouvoir déduire avec une grande fiabilité la phase de latence et le taux de croissance³.

Le Comité scientifique estime que, contrairement aux aliments de catégorie 2 (où la réalisation d'un challenge test limité suffit pour vérifier les connaissances de la littérature, les modèles prévisionnels, etc.), dans le cas de la catégorie 3, ce challenge test limité doit être répété plusieurs fois pour tenir suffisamment compte de l'hétérogénéité de l'aliment et de la chaîne de production lorsqu'on établit la valeur de tolérance le jour 0 (voir points 4.3.2 et 4.3.3).

Point 4 : « Protocole d'un challenge test » (pour les denrées alimentaires de la catégorie 3)

Dans cette partie du document, on explique de quelle manière un challenge test doit être effectué.

Le procédé de fabrication de la denrée alimentaire en question doit être succinctement décrite (point 4.1.1). Cette description peut normalement être déduite du système HACCP qui doit être disponible dans l'entreprise.

En plus des caractéristiques relatives à l'aliment mentionnées au point 4.1.2, il faudrait indiquer explicitement quel est le profil temps / température que l'on prévoit pour l'aliment. Ce sont 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.

En ce qui concerne le choix des souches pour le challenge test, décrit au point 4.2.1, il faut faire remarquer qu'il n'est pas toujours possible d'isoler une souche de l'aliment en question. Si une souche peut être isolée, une identification correcte de cette souche est nécessaire. Le Comité scientifique conseille d'utiliser de préférence des isolats d'aliment qui sont bien identifiés et qui sont bien caractérisés en ce qui concerne leurs caractéristiques de croissance et leur morphologie. Ensuite, le Comité scientifique estime qu'il n'est pas nécessaire d'étudier séparément les deux souches sélectionnées. Après culture, les deux souches peuvent être mélangées préalablement à leur inoculation dans/sur 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/sur l'aliment en question.

Pour la préparation de l'inoculum (point 4.2.2), il devrait être spécifié que 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 latence⁴. Le nombre de cellules inoculées doit être égal à 100 à 1000 cellules par portion d'aliment

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

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

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 denrées alimentaires naturellement contaminées, et parce que la flore compétitive peut alors être masquée et qu'on obtient alors 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, comme mentionné dans le document, il faut donc choisir soigneusement la taille de la portion de l'aliment. En outre, on doit déterminer la concentration de *L. monocytogenes* de l'inoculum et de l'aliment (aussi bien avant qu'immédiatement après l'inoculation), étant donné qu'il peut toujours y avoir des cellules de *L. monocytogenes* présentes dans l'aliment avant l'inoculation. Le Comité scientifique doute que la directive donnée dans le document pour le choix de la température à laquelle la préculture est réalisée soit suffisamment opérationnelle. Souvent, à une température plutôt basse, on ne sait actuellement pas précisément en quel laps de temps la préculture va se développer et jusqu'à quel niveau, ce qui entrave le planning et la réalisation du challenge test. La température de préculture doit être bien choisie de telle sorte qu'une préculture standardisée de cellules soit obtenue dans la phase stationnaire, ce qui permet d'atteindre facilement la concentration initiale visée (ufc/g d'aliment).

Dans la description de l'inoculation dans l'aliment (point 4.2.3), il est spécifié que plusieurs inoculations sont éventuellement nécessaires. Il convient d'indiquer qu'il s'agit d'inoculations faites à partir du même inoculum en différents endroits de l'aliment (en vue de répartir l'inoculum sur l'ensemble de la masse/du volume/de la surface de l'aliment), et de donner une série d'exemples : une inoculation dans et sur l'aliment simule une contamination d'aliments préparés par mélange de plusieurs matières premières (par ex. une salade), tandis qu'une inoculation sur la surface de l'aliment simule une post-contamination (par ex. pâté). La phrase « pour le cas d'un aliment cuit, l'inoculation peut être réalisée sur une matrice stérile pour simuler une recontamination après traitement technique » devrait être abandonnée, car le but n'est pas de stériliser réellement l'aliment, mais d'ensemencer un aliment représentatif, présentant une flore d'accompagnement représentative.

Si le challenge test n'est pas effectué à température constante mais avec un profil temps / température (point 4.3.1), il est indiqué de standardiser ce profil. Étant donné qu'il n'existe pour l'instant pas de norme internationale permettant de le faire (par ex. ISO), le Comité scientifique propose de choisir provisoirement le profil de telle façon 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).

Pour ce qui est du nombre d'analyses par lot de l'aliment (point 4.3.2), le minimum de trois répétitions par point d'analyse du challenge test semble superflu. En effet, ces répétitions fournissent essentiellement des informations sur l'incertitude de mesure, qui devrait être bien maîtrisée dans les laboratoires accrédités. Ce qui est par contre important, c'est de tenir suffisamment compte de l'éventuelle hétérogénéité au sein d'un lot. Le Comité scientifique propose donc que l'on teste au minimum deux unités par lot. Ceci signifie qu'il recommande d'effectuer le challenge test en double pour chaque lot (inoculation de deux unités par lot, à analyser le jour 0 et en fin de conservation (DLC)).

En ce qui concerne le nombre de lots à tester (point 4.3.3), le Comité scientifique propose que trois lots soient testés au minimum.

Le nombre de challenge tests peut 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 et du degré de mise en place et de vérification du système HACCP au sein de l’entreprise (voir plus loin : exemples).

Enfin, il faut accorder une attention suffisante à l’interprétation des résultats du challenge test (point 4.4.2). Idéalement, l’interprétation devrait tenir compte de l’incertitude de mesure. Mais, pour l’instant il n’y a pas de clarté au niveau européen en ce qui concerne la gestion de l’incertitude de mesure dans l’interprétation des résultats de tests microbiologiques. En attendant un consensus européen, un certain nombre d’exemples dans lesquels on applique une interprétation plutôt pratique sont présentés (sans vraiment tenir compte de l’incertitude de mesure). Cette méthode consiste à prendre en considération le potentiel de multiplication maximal observé (ce qui, en fait, reflète le “worst case scenario”) en fixant la valeur de tolérance au jour 0. Il est indiqué d’ajuster cette méthode pratique d’interprétation dès que des instructions européennes sur la gestion de l’incertitude de mesure pour les résultats de tests microbiologiques seront disponibles.

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 6 valeurs de points de mesure le jour 0 et en fin de conservation.

Exemple 1

Jour 0		Fin de conservation (DLC)		DLC – Jour 0 (Différence en log)
ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	ufc/g	Log ₁₀ (ufc/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

Les résultats peuvent être interprétés de la façon suivante.

- La différence maximale observée entre les dénombrements à la date limite d’utilisation et au jour 0 est de 2,02 unités log.
- Pour déduire la valeur de tolérance au jour 0, on peut se baser sur le Tableau 1. Ce tableau montre comment une valeur de tolérance adéquate peut être déterminée pour le jour 0 en fonction de la différence observée maximale. Dans notre exemple, (différence maximale observée de 2,02 unités log), la valeur de tolérance est “absence de *L. monocytogenes* dans 10 g”. Il y a lieu de faire remarquer que l’utilisation de la différence maximale observée (p.ex. au lieu de la moyenne) implique, en fait, qu’on tient compte d’un certain type de “worst case scenario”.
- Lorsque, lors de contrôle par le fabricant ou l’autorité, la présence de *L. monocytogenes* dans 10 g au jour 0 est constatée, 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.

Tableau 1: Détermination de la valeur de tolérance le jour 0 en fonction de la différence observée maximale.

Différence maximale observée log ₁₀ (ufc/g)	Valeur de tolérance le jour 0
Entre -1,00 et 0,00	Absence dans 0.01 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 10 g
--------------------	-------------------

Exemple 2

(Seul le quatrième challenge test donne un autre résultat que dans l'exemple 1 pour DLC).

Jour 0		Fin de conservation (DLC)		DLC – Jour 0 (Différence en log)
ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	ufc/g	Log ₁₀ (ufc/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

Les résultats peuvent être interprétés de la façon suivante.

- La différence maximale observée entre les dénombrements à la date limite d'utilisation et au jour 0 est de 1,41 unités log.
- Sur base du Tableau 1, on peut déduire une valeur de tolérance "absence de *L. monocytogenes* dans 1 g".
 - Lorsque, lors de contrôle par le fabricant ou l'autorité, la présence de *L. monocytogenes* dans 1 g au jour 0 est constatée, 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.

Exemple 3

Jour 0		Fin de conservation (DLC)		DLC – Jour 0 (Différence en log)
ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	ufc/g	Log ₁₀ (ufc/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

Les résultats peuvent être interprétés de la façon suivante.

- La différence maximale observée entre les dénombrements à la date limite d'utilisation et au jour 0 est de 0,6 unités log.
- Sur base du Tableau 1, 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, la présence de *L. monocytogenes* dans 0,1 g au jour 0 est constatée, 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.

Exemple 4

Jour 0		Fin de conservation (DLC)		DLC – Jour 0 (Différence en log)
ufc/g	Log ₁₀ (ufc/g)	ufc/g	Log ₁₀ (ufc/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

- Les résultats peuvent être interprétés de la façon suivante.
- La différence maximale observée entre les dénombrements à la date limite d'utilisation et au jour 0 est de 0,42 unités log.
- Sur base du Tableau 1, 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, la présence de *L. monocytogenes* dans 0,1 g au jour 0 est constatée, 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 maximale observée est du même ordre de grandeur que celui des exemples des challenge tests réduits pour les denrées de catégorie 2. Toutefois, ceci ne peut pas faire conclure qu'une denrée alimentaire de catégorie 3 peut être classée dans la catégorie 2 lorsque la différence maximale observée est suffisamment faible (voire négative). Contrairement aux denrées alimentaires de catégorie 3, il existe en effet, pour la catégorie 2, des données scientifiques publiées dont il ressort qu'il ne peut pas y avoir de multiplication.

Remarque

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 inhibée. 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*.

Pour le Comité scientifique,
 Prof. A. Huyghebaert,
 Président
 Bruxelles, le 24 février 2006

Annexe : incertitude de mesure des déterminations microbiologiques quantitatives

Concernant les résultats d'analyse de déterminations microbiologiques dans les denrées alimentaires, on peut définir l'incertitude de mesure comme une grandeur qui indique la dispersion possible 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 (dénombrement) 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 (*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*). 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 en fait qu'il n'est pas question de croissance démontrable 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 à émettre 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 boîte 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 rule 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, le Comité scientifique conseille de se baser provisoirement sur l'incertitude de mesure de 0,5 unité log indiquée ci-dessus lors de l'interprétation des résultats des challenge tests pour les denrées alimentaires de catégorie 2 (comme indiqué également ci-devant), étant donné que, pour l'instant, une meilleure estimation de l'incertitude de mesure (ou une méthodologie pour faire cette estimation) pour les faibles concentrations n'est pas disponible.