

AVIS 02-2016

Concerne : Tests de provocation et tests de vieillissement pour *Listeria monocytogenes* dans le fromage (dossier SciCom 2015/17).

Avis approuvé par le Comité scientifique le 19 février 2016.

Résumé

Le Règlement (CE) N° 2073/2005 de la Commission européenne du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires présente, entre autres, des critères microbiologiques relatifs aux denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de *Listeria monocytogenes*. Afin de respecter ces critères, il convient, dans certains cas, de réaliser des études. A cette fin, le laboratoire européen de référence pour *Listeria monocytogenes* (EURL Lm) a établi un guide technique pour l'exécution des tests de provocation (challenge tests) et des tests de vieillissement de *Listeria monocytogenes* dans des denrées alimentaires prêtes à être consommées. Ces tests ont pour objectif d'évaluer le potentiel de croissance et le taux de croissance maximum de *Listeria monocytogenes* au cours de la durée de conservation des denrées alimentaires prêtes à être consommées qui sont mises sur le marché. Par ailleurs, l'AFSCA a rédigé une note de service plus précise pour une application harmonisée en Belgique du présent guide technique.

Il a été demandé au Comité scientifique de fournir des éclaircissements sur le guide technique susmentionné et plus particulièrement en ce qui concerne l'exécution des tests de provocation et des tests de vieillissement de *Listeria monocytogenes* dans le fromage. En ce qui concerne les tests de provocation, des questions ont été posées sur l'inoculation, les mesures de pH et de l' a_w (activité de l'eau), les analyses microbiologiques, les recommandations relatives à la température et à la durée de conservation et l'extrapolation des résultats aux autres fromages. En ce qui concerne les tests de vieillissement, des questions ont été posées sur les mesures de pH et de l' a_w , les analyses microbiologiques, les recommandations relatives à la température et à la durée de conservation, l'extrapolation des résultats aux autres fromages et l'utilisation des tests de vieillissement comme alternative aux tests de provocation. En outre, un certain nombre de questions sur l'interprétation du guide technique ont été posées.

Dans cet avis, le Comité formule des réponses aux questions. *Listeria monocytogenes* peut contaminer le fromage par différentes voies de contamination. Le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* peut être étudié au moyen de tests de provocation et/ou de tests de vieillissement. La contamination initiale du fromage par *Listeria monocytogenes* peut provenir du lait (cru) utilisé pour la fabrication du fromage, de l'environnement de production (équipement, outils, infrastructures, etc.) ou du personnel impliqué dans la production, la maturation, l'affinage, la coupe et le conditionnement du fromage.

Une contamination provenant du lait (cru) peut être simulée par une inoculation du lait utilisé pour la production de fromage (via une étude pilote) ou par une inoculation dans le cœur du

fromage. Le choix de la méthode de l'inoculation artificielle de *Listeria monocytogenes* (inoculation dans le cœur et/ou à la surface (de coupe) du fromage) dépend de la voie de contamination la plus probable, qui dépend du type de fromage, des propriétés physicochimiques, du processus de production du fromage et de l'objectif du client. L'inoculum peut éventuellement modifier les propriétés intrinsèques du produit au niveau des zones d'injection. Il est donc indiqué dans le guide technique que le rapport entre l'inoculum et le produit ne peut pas dépasser 1 % de la masse (ou du volume) de l'unité de test. Conformément au guide technique, l'inoculation doit être effectuée après affinage du fromage, le premier jour de la durée de conservation (jour 0), autrement dit, au moment où le fromage est commercialisé comme denrée alimentaire prête à être consommée. Eventuellement, le fromage porte une étiquette spécifiant les conditions de conservation recommandées. Conformément au guide technique, le niveau initial de contamination doit être égal à environ 100 ufc (unités formant colonie)/g. Un potentiel de croissance de > 0,5 unités log estimé à un niveau de contamination initial de 100 ufc/g n'est pas considéré comme significativement différent par rapport à un potentiel de croissance attendu à un niveau de contamination initial de 10 ufc/g. Les tests de provocation doivent de préférence être effectués avec des souches de *Listeria monocytogenes* bien caractérisées comme il est indiqué dans le guide technique et non avec des souches de *Listeria innocua*.

Tant pour les tests de provocation que pour les tests de vieillissement, il convient de procéder aux mesures du pH et de l' a_w au jour 0 et à la date limite de consommation, une fois sur un échantillon par lot. Celles-ci doivent être réalisées dans le cœur et/ou sur la surface du fromage, au niveau du site d'inoculation pour un test de provocation ou selon la voie de contamination la plus probable pour un test de vieillissement. Les recommandations en matière de durée et de température de conservation sont quant à elles indiquées dans le tableau 3 du guide technique et sont en outre expliquées dans la note de service de l'AFSCA. Les résultats des tests de provocation et des tests de vieillissement sont extrapolables uniquement à des lots du même type de fromage. Des tests de vieillissement peuvent servir comme alternative aux tests de provocation, si un nombre d'analyses suffisant est réalisé tant au jour 0 qu'au dernier jour de la durée de conservation.

Le Comité scientifique recommande d'adopter une approche hygiénique, de respecter autant que possible la chaîne du froid, d'éviter les contaminations croisées avec *Listeria monocytogenes* et, sur base de bonnes pratiques de travail et d'hygiène (GMP et GHP), de viser l'absence de *Listeria monocytogenes* dans le fromage. Enfin, certaines recommandations sont formulées au sujet de l'interprétation du guide technique.

Summary

Advice 02-2016 of the Scientific Committee of the FASFC on challenge tests and durability tests for *Listeria monocytogenes* in cheese

In Regulation (EC) No 2073/2005 of the European Commission of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, i.a. microbiological criteria are established concerning ready-to-eat foods able to support the growth of *Listeria monocytogenes*. In order to comply to this criteria, in some cases studies have to be performed. Therefore, the European reference laboratory for *Listeria monocytogenes* (EURL *Lm*) has established a technical guidance document for conducting challenge tests and durability tests for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. These tests aim to evaluate the growth potential or the maximum growth rate of *Listeria monocytogenes* during the shelf-life of ready-to-eat foods placed on the market. Furthermore, the FASFC prepared a service note with further clarification in order to achieve a harmonized application of this technical guidance document in Belgium.

The Scientific Committee was asked to provide clarification concerning the above-mentioned technical guidance document and in particular concerning the conducting of challenge tests and durability tests for *Listeria monocytogenes* in cheese. For challenge tests, questions are asked about the inoculation, the measurement of the pH and a_w (water activity), the

microbiological analyzes, the recommendations for the storage temperature and duration and the extrapolation of the results to other cheeses. For durability tests, questions are asked about the measurement of the pH and a_w , the microbiological analyzes, the recommendations for the storage temperature and duration, the extrapolation of the results to other cheeses and the utilization of durability tests as an alternative for challenge tests. Next to this, some questions are asked about the interpretation of the technical guidance document.

In this advice, an answer is formulated to the questions. *Listeria monocytogenes* can contaminate cheese via several contamination routes. The growth potential of *Listeria monocytogenes* can be studied by means of challenge tests and/or durability tests. An initial contamination of cheese with *Listeria monocytogenes* may come from the (raw) milk used to produce the cheese, from the production environment (equipment, tools, infrastructure, etc.) or from the staff involved in the production, ripening, affinage, cutting and packaging of the cheese.

A contamination coming from the (raw) milk can be simulated by means of inoculation of the milk that is used for the production of cheese (via a pilot study) or by means of inoculation in the core of the cheese. The choice of the way of artificial inoculation of *Listeria monocytogenes* (inoculation in the core and/or on the (cutting) surface of the cheese) depends on the most probable contamination route which depends on the type of cheese, the physical-chemical properties, the production process of the cheese and the aim of the customer. The inoculum can possibly change the intrinsic properties of the product at the level of the injection zones. Therefore, it is stated in the technical guidance document that the ratio of the inoculum and the product should not be higher than 1 % of the mass (or the volume) of the test unit. In accordance with the technical guidance document, the inoculation has to be conducted after the ripening of the cheese on the first day of the shelf-life (day 0), i.e. the moment that the cheese is placed on the market as a ready-to-eat food. Potentially, the cheese contains a label specifying the recommended storage conditions. In accordance with the technical guidance document, the initial contamination level has to be about 100 cfu (colony forming units)/g. An estimated growth potential of $> 0,5$ log units at an initial contamination level of 100 cfu/g is not considered as being significantly different in comparison with an expected growth potential at an initial contamination level of 10 cfu/g. Challenge tests should preferably be performed with well characterized strains of *Listeria monocytogenes* as prescribed in the technical guidance document and not with strains of *Listeria innocua*.

For challenge tests as well as for durability tests, the measurements of the pH and a_w have to be performed at day 0 and at the last day of the shelf-life one time on one sample per batch. They should be done in the core and/or on the surface of the cheese, at the level of the place of inoculation for a challenge test or in accordance with the most probable contamination route for a durability test. The recommendations for storage duration and temperature are given in table 3 of the technical guidance document and are further explained in the service note of the FASFC. The results of challenge tests and durability tests can only be extrapolated to batches of the same type of cheese. Durability tests can serve as an alternative for challenge tests if sufficient analyzes are performed on day 0 as well as on the last day of the shelf-life.

The Scientific Committee recommends to work in a hygienic way, to respect the cold chain as good as possible, to avoid cross contaminations with *Listeria monocytogenes* and to strive to absence of *Listeria monocytogenes* in cheese from the good manufacturing and hygienic practices (GMP and GHP). Finally, some recommendations are made regarding the interpretation of the technical guidance document.

Mots clés

Listeria monocytogenes, fromage, test de provocation (challenge test), test de vieillissement

1. Termes de référence

1.1. Questions

Un certain nombre de questions ont été soumises au Comité scientifique. Elles sont répertoriées ci-dessous.

Questions concernant les tests de provocation (challenge tests) pour *Listeria monocytogenes* dans le fromage

1. en ce qui concerne l'inoculation :
 - a. Comment une contamination du lait utilisé pour la fabrication du fromage peut-elle être simulée ?
 - b. Comment l'inoculation doit-elle être réalisée (dans le cœur ou à la surface ; par type de fromage ; quelle méthode) ?
 - c. Est-ce qu'une injection modifie les propriétés intrinsèques du fromage au niveau des zones d'injection ?
 - d. Quelles possibilités de contamination doivent être simulées (contamination du lait, contamination pendant ou après la production du fromage, etc.) ?
 - e. A quel stade de fabrication du fromage l'inoculation doit-elle intervenir (avant ou après l'affinage) ?
 - f. Un niveau de contamination initial de 10 ufc (unités formant colonie)/g peut-il être utilisé pour mimer une situation plus réaliste ?
 - g. En sachant que le niveau de contamination initial est le facteur qui influe le plus sur le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes*, est-ce qu'un potentiel de croissance supérieur à 0,5 unités log est le même pour un niveau de contamination initial de 100 ufc/g et pour un niveau de contamination initial de 10 ufc/g ?
 - h. Peut-on utiliser un potentiel de croissance supérieur à 0,5 unités log pour déterminer la durée de conservation finale de *Listeria monocytogenes* et pour déterminer une valeur limite intermédiaire, pour laquelle le critère de 100 ufc/g est respecté ?
 - i. Les tests de provocation avec *Listeria innocua* sont-ils acceptés et si oui, où faut-il se procurer cette souche ?
2. A quel moment et sur combien d'échantillons en provenance de combien de lots convient-il de mesurer le pH et l' a_w (activité de l'eau), sachant que ces paramètres évoluent en fonction de la durée de conservation du fromage et combien de fois convient-il de répéter l'opération ?
3. en ce qui concerne les analyses microbiologiques :
 - a. Sur combien d'échantillons en provenance de combien de lots convient-il d'effectuer les analyses microbiologiques ?
 - b. Quelle est la finalité d'autres analyses microbiologiques telles que le dénombrement de germes totaux à 22 °C, de la flore lactique, de levures, etc. et comment doivent-elles être interprétées ?
4. Quelles sont les recommandations pour la température et la durée de conservation ou les autres facteurs importants à prendre en considération ?
5. Dans quelle mesure les résultats des tests de provocation sont-ils extrapolables à d'autres fromages du même type ou d'autres types ?

Questions relatives aux tests de vieillissement de *Listeria monocytogenes* dans le fromage

1. Dans quelle mesure un test de vieillissement de *Listeria monocytogenes* dans le fromage peut-il servir comme alternative à un test de provocation ?

Si un test de vieillissement peut servir comme alternative à un test de provocation, les questions suivantes sont posées au Comité scientifique :

2. A quel moment et sur combien d'échantillons en provenance de combien de lots convient-il de mesurer le pH et l' a_w , sachant que ces paramètres évoluent en fonction de la durée de conservation du fromage et combien de fois convient-il de répéter l'opération ?
3. Sur combien d'échantillons en provenance de combien de lots convient-il d'effectuer les analyses microbiologiques ?
4. Quelles sont les recommandations pour la température et la durée de conservation ou les autres facteurs importants à prendre en considération ?
5. en ce qui concerne l'interprétation du guide technique :
 - a. Comment faut-il interpréter la règle $n/N < 10 \%$ et l'interprétation de plus de 10 échantillons sur un lot de plus de 100 paquets/unités est-elle correcte ?
 - b. Comment faut-il interpréter le tableau concernant les valeurs p et les intervalles de confiance, et dans quels cas les risques sont-ils évalués comme étant faibles ou élevés ?

1.2. Contexte législatif

- Règlement (CE) N° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires
- Règlement (UE) N° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) n° 1924/2006 et (CE) n° 1925/2006 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 87/250/CEE de la Commission, la directive 90/496/CEE du Conseil, la directive 1999/10/CE de la Commission, la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil, les directives 2002/67/CE et 2008/5/CE de la Commission et le règlement (CE) n° 608/2004 de la Commission
- Arrêté royal du 13 juillet 2014 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires

Vu les discussions durant les réunions du groupe de travail du 22 octobre 2015 et du 16 décembre 2015 et les séances plénières du 18 décembre 2015, du 29 janvier 2016 et du 19 février 2016 ;

le Comité scientifique émet l'avis suivant:

2. Introduction

Suite à un rappel de fromages au lait cru contaminés par *Listeria monocytogenes*, le Ministre Borsus a décidé de mettre en place au sein de l'AFSCA une structure d'accompagnement pour les petits producteurs. Le soutien scientifique est l'un des piliers de cet accompagnement. Une concertation a eu lieu avec le secteur des produits laitiers le 25 juin

2015. Il a été décidé de soumettre une demande d'avis au Comité scientifique sur la réalisation des tests de provocation et des tests de vieillissement pour *Listeria monocytogenes* dans le fromage.

Le Règlement (CE) N° 2073/2005 de la Commission européenne du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires¹ présente, entre autres, des critères microbiologiques relatifs aux denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de *Listeria monocytogenes* (voir tableau 1).

Tableau 1. Critères de sécurité des denrées alimentaires pour *Listeria monocytogenes* suivant le Règlement (CE) N° 2073/2005

Catégorie de denrées alimentaires	Plan d'échantillonnage ^a		Limites ^b		Stade d'application du critère
	n	c	m	M	
Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales	5	0	100 ufc/g ^c		Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
			Absence dans 25 g ^d		Avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriquée
Denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales ^e			100 ufc/g		Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

^a n = nombre d'unités constituant l'échantillon ; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs comprises entre m et M.
^b Les limites m et M sont les valeurs entre lesquelles peut se trouver un certain nombre de sous-échantillons ('c') du nombre total de sous-échantillons composant l'échantillon ('n').
^c Ce 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 toute la durée de conservation. L'exploitant peut fixer, pendant le procédé, des valeurs intermédiaires suffisamment basses pour garantir que la limite de 100 ufc ne sera pas dépassée au terme de la durée de conservation.
^d Ce critère est applicable aux produits avant qu'ils ne quittent le contrôle immédiat de l'exploitant du secteur alimentaire, lorsque celui-ci 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 toute la durée de conservation.
^e Les produits avec un pH ≤ 4,4 ou une a_w ≤ 0,92, les produits avec un pH ≤ 5,0 et une a_w ≤ 0,94, les produits à durée de conservation inférieure à 5 jours appartiennent automatiquement à cette catégorie. D'autres genres de produits peuvent aussi appartenir à cette catégorie, sous réserve d'une justification scientifique.

Le même Règlement (CE) N° 2073/2005, article 3, paragraphe 2, spécifie que les exploitants du secteur alimentaire responsables de la fabrication du produit conduisent, le cas échéant, des études afin d'examiner si les critères microbiologiques sont respectés pendant toute la durée de conservation. Cette disposition s'applique notamment aux denrées alimentaires prêtes à être consommées, permettant le développement de *Listeria monocytogenes* et susceptibles de présenter un risque pour la santé publique. Il a déjà été constaté dans un avis auto-saisine du Comité scientifique de l'AFSCA (SciCom, 2015) et dans la littérature scientifique internationale que ce sont principalement les fromages à pâte molle et à pâte mi-dure fabriqués à partir de lait cru ou pasteurisé qui constituent un produit à risque en ce qui concerne *Listeria monocytogenes* (Lahou & Uyttendaele, 2015; Ruckerl *et al.*, 2014; Schoder *et al.*, 2015; Verraes *et al.*, 2015).

¹ <http://EUR-Lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20140601&qid=1447775099953&from=fr>

Conformément à l'annexe II du Règlement (CE) N° 2073/2005, ces études doivent inclure ce qui suit :

- « la détermination des caractéristiques physicochimiques du produit, telles que pH, a_w , teneur en sel, concentration des conservateurs et système d'emballage, compte tenu des conditions d'entreposage et de transformation, des possibilités de contamination et de la durée de conservation prévue, la consultation de la littérature scientifique disponible et la recherche d'informations sur les caractéristiques de développement et de survie des micro-organismes concernés.

Le cas échéant, l'opérateur du secteur alimentaire mène, sur la base des études susmentionnées, des études complémentaires pouvant comporter:

- l'élaboration de modèles mathématiques prédictifs pour la denrée alimentaire en question, en utilisant des facteurs de croissance ou de survie critiques pour les micro-organismes concernés présents dans le produit,
- des essais visant à étudier la capacité du micro-organisme en question inoculé de manière appropriée à se reproduire ou à survivre dans le produit dans différentes conditions d'entreposage raisonnablement prévisibles,
- des études visant à évaluer la croissance ou la survie des micro-organismes en question qui peuvent être présents dans le produit pendant sa durée de conservation dans des conditions de distribution, d'entreposage et d'utilisation raisonnablement prévisibles.

Les études susmentionnées tiennent compte de la variabilité inhérente au produit, aux micro-organismes en question (dans ce cas : *Listeria monocytogenes*) ainsi qu'aux conditions de transformation et d'entreposage ».

Dans le but d'éclaircir davantage l'approche de telles études, un document de travail des services de la Commission européenne (non adopté ou approuvé par la Commission européenne) reprend des orientations concernant les tests de vieillissement de *Listeria monocytogenes* dans les denrées alimentaires prêtes à être consommées en application du Règlement (CE) N° 2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires². L'objectif principal de ce document est de guider les exploitants du secteur alimentaire qui produisent des denrées alimentaires prêtes à être consommées afin qu'ils puissent savoir comment :

- démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que les produits sont conformes à au règlement de l'Union européenne jusqu'au terme de la durée de conservation ;
- appréhender les différentes approches utiles pour la définition d'une durée de conservation sans risque par rapport à *Listeria monocytogenes* et décider de l'approche appropriée pour leurs produits, et
- classer leurs produits en denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant, ou ne permettant pas, le développement de *Listeria monocytogenes*.

Par ailleurs, le laboratoire européen de référence pour *Listeria monocytogenes* (EURL *Lm*), en concertation avec des experts de différents laboratoires nationaux de référence (LNR), a établi le « EURL *Lm* technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food »³ (ci-après, appelé le guide technique). C'est un guide sur la réalisation des tests de provocation et des tests de vieillissement. Il existe deux types de tests de provocation : un test de provocation pour déterminer le potentiel de croissance et un test de provocation pour déterminer le taux de croissance maximal. Cet avis se limitera au premier.

Afin d'obtenir une application harmonisée et appropriée de ce guide technique en Belgique, l'AFSCA a clarifié un certain nombre de points dans une note de service dont l'objet est le suivant : accréditation des laboratoires pour le challenge test *Listeria monocytogenes* selon le

² http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/translation_guidance_lm_fr.pdf

³ http://ec.europa.eu/food/food/bio_safety/salmonella/docs/technical_guidance_listeria_en.pdf

« Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to eat foods »⁴.

L'organisation wallonne DiversiFerm qui a pour mission d'accompagner les producteurs dans leurs activités de diversification a posé quelques questions spécifiques à l'AFSCA sur ce dernier document.

3. Méthodologie

Tout d'abord, le Comité scientifique a formulé quelques remarques générales sur la problématique concernant le risque de *Listeria monocytogenes* dans les fromages afin de fournir des clarifications sur l'objet du guide technique, sur l'étiquetage des fromages ainsi que sur la durée de conservation des fromages. Ensuite, une réponse a été donnée aux questions posées (voir termes de référence). Ces réponses sont basées sur l'opinion d'experts, des résultats de publications scientifiques et des informations recueillies auprès de plusieurs experts.

4. Remarques générales

4.1. Objectif du guide technique

L'évaluation du potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* au cours du processus de production du fromage fait partie de la validation du plan HACCP du producteur et sort du cadre du guide technique.

Le guide technique a pour objectif d'évaluer le potentiel de croissance ou le taux de croissance maximum de *Listeria monocytogenes* au cours de la durée de conservation de produits prêts à être consommés qui sont mis sur le marché.

L'objectif des tests de provocation est d'estimer si *Listeria monocytogenes* est capable de se développer et atteindre des nombres ≥ 100 ufc/g pendant la durée de conservation prévue ou jusqu'à la date limite de consommation, lorsqu'une contamination initiale de *Listeria monocytogenes* est constatée après un échantillonnage de 5 unités d'échantillonnage d'un lot de fromage pour lequel un ou plusieurs échantillons se révèlent positifs par 25 grammes de produit au jour 0 ou pendant la durée de conservation après la commercialisation des produits.

Le but des tests de vieillissement est de pouvoir suivre des lots en continu d'une part pour déterminer si un lot est contaminé par *Listeria monocytogenes* ou non et, d'autre part, afin de déterminer si le lot permet le développement de *Listeria monocytogenes* jusqu'à un nombre ≥ 100 ufc/g à la fin de la durée de conservation du produit.

4.2. Début de la durée de conservation

Dans le cadre de la détermination du moment de l'inoculation du fromage (voir point 5.1.1.e.), les responsabilités des producteurs concernant la durée de conservation sont clarifiées dans les paragraphes ci-dessous.

Dans le cas où le fromage n'est pas fabriqué par un seul producteur mais par une succession de différents opérateurs de la chaîne alimentaire associés à la transformation, au stockage et à la distribution, il se peut qu'il y ait confusion quant au producteur qui porte la responsabilité de la détermination de la durée de conservation (dans certaines conditions de conservation) et du moment de la commercialisation du fromage. Cela peut s'appliquer lorsqu'un fabricant de fromage fournit des produits à des grossistes ou à une fromagerie où le fromage subit une nouvelle maturation (affinage). Dans ce cas, il devrait y avoir concertation entre ces acteurs de la chaîne alimentaire concernant l'acteur qui détermine la durée de conservation (et les

4

http://www.afsca.be/laboratories/approved/unboratories/officecircular/c_neURuments/1238983_challenge-test_fr-nl_000.pdf

conditions de conservation associées) et le moment auquel le fromage est considéré comme prêt à être mis sur le marché, ainsi que le début (jour 0) de la durée de conservation.

Si la durée de conservation et les conditions de conservation associées du fromage sont définies par le producteur et qu'un acteur ultérieur (p. ex. le maître-affineur) de la chaîne alimentaire s'écarte délibérément de ces prescriptions de conservation, il revient à cet acteur de garantir la sécurité alimentaire en ce qui concerne *Listeria monocytogenes* pour le fromage en question pendant la suite du stockage ou de l'affinage ainsi que d'adapter la durée de conservation et les conditions de conservation associées proposées au préalable lorsque le fromage est effectivement être distribué.

5. Réponses aux questions posées

5.1. Tests de provocation pour *Listeria monocytogenes* dans le fromage

5.1.1. Inoculation

- a. Comment une contamination du lait utilisé pour la fabrication du fromage peut-elle être simulée ?

Possibilités de contamination du fromage par *Listeria monocytogenes*

La contamination initiale du fromage par *Listeria monocytogenes* peut provenir du lait (cru) utilisé pour la fabrication du fromage, de l'environnement de production (équipement, outils, infrastructures, etc.) ou du personnel impliqué dans la production, la maturation, l'affinage, la coupe et le conditionnement du fromage (dans la distribution).

Inoculation du lait

L'inoculation du lait utilisé pour la fabrication du fromage est une des possibilités pour simuler une contamination du fromage par *Listeria monocytogenes* à partir du lait (cru), a fortiori quand il s'agit de fromages à base de lait cru. Dans le cadre de cet essai, l'historique des stress auxquels *Listeria monocytogenes* est exposée au cours du processus de production de fromage (pH réduit, augmentation de la teneur en sel, microflores concurrentes) est présent de manière maximale. Conformément au guide technique et à la note de service de l'AFSCA, le niveau de contamination initial de *Listeria monocytogenes* après la fabrication du fromage (et pour les fromages à affiner, après l'affinage des fromages) au jour 0 de la durée de conservation (le moment où le fromage est considéré comme prêt à être mis sur le marché) doit être d'environ 100 ufc par gramme de fromage (voir point 5.1.1.f.). Ceci est important pour définir et surveiller le potentiel de croissance au cours de la durée de conservation en vue de l'harmonisation des tests de provocation. Il n'est pas évident, lors de l'ensemencement du lait cru avant le processus de production du fromage, de se faire une bonne idée du niveau de contamination de *Listeria monocytogenes* après le processus de fabrication du fromage, puisqu'il est susceptible d'augmenter ou de diminuer tout au long du processus de production du fromage. Il s'agit par conséquent d'un processus fastidieux par essais et erreurs. Une telle conception des tests de provocation nécessite aussi un équipement pilote afin de simuler le processus industriel. A l'échelle pilote, il est possible, lorsque les installations le permettent, de travailler en conformité avec les exigences associées, en matière de biosécurité, au travail avec une bactérie pathogène pour l'homme comme *Listeria monocytogenes*, appartenant à la classe de biosécurité BL2. Si une telle conception de l'essai fait partie des possibilités et peut être exécutée de manière contrôlée, cela doit être préférablement réalisé.

Inoculation dans le fromage

L'inoculation dans le cœur du fromage est une autre possibilité acceptable pour simuler le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* contaminant le lait cru. Elle peut être réalisée, après la production du fromage, par l'injection de *Listeria monocytogenes* dans le cœur du fromage, où il faudrait parvenir à un niveau de contamination initial de *Listeria monocytogenes* d'environ 100 ufc par gramme de fromage au jour 0 de la durée de conservation, conformément au guide technique (voir section 5.1.1.f.).

- b. Comment l'inoculation doit-elle être réalisée (dans le cœur ou à la surface ; par type de fromage ; quelle méthode) ?

Tel que mentionné au point 5.1.1.a., *Listeria monocytogenes* peut contaminer le fromage par différentes voies. Par conséquent, les différentes façons possibles d'inoculer artificiellement *Listeria monocytogenes* dépendent de la voie de contamination la plus probable, qui dépend du type de fromage, des propriétés physicochimiques, du processus de production du fromage et des renseignements fournis dans la littérature scientifique (voir les études mentionnées à l'annexe II du Règlement (CE) N° 2073/2005). La voie d'inoculation sera aussi partiellement déterminée par le demandeur des tests de provocation, p. ex. le producteur qui détermine la durée de conservation et les conditions de conservation associées à un fromage ou à une boule de fromage (intact(e), non tranché(e)) après la production, l'acheteur qui veut examiner l'effet d'une post-contamination et son influence sur la durée de conservation après affinage ultérieur du fromage, le grossiste en fromages ou les (chaînes de) magasins qui entendent examiner un stockage intermédiaire à long terme de fromage en tranches, etc. A l'instar de ce qui se passe dans d'autres secteurs alimentaires, la conception de l'essai, qui intervient dans le cadre tracé par le guide technique, est soumise à des variations qui dépendent de la problématique précise ou de l'objectif du client.

Comme indiqué ci-dessus, une inoculation artificielle peut être effectuée dans le cœur du fromage. Cette inoculation peut être réalisée si on considère que la source de contamination la plus probable est le lait cru ou, pendant les premiers stades de la production, l'environnement de production ou le personnel (p. ex. pendant le pressage du caillé ou le saumurage). L'inoculation dans le cœur peut éventuellement être effectuée par injection dans le fromage (p. ex. dans les petites boules de fromage ou dans les grands fromages). Afin de bien assurer le suivi du potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* dans le laboratoire, d'obtenir des résultats d'analyse dénombrables et la chance de retrouver *Listeria monocytogenes* dans une unité test lorsque celle-ci est un sous-échantillon d'une plus grosse unité de test inoculée initialement, il est indiqué d'obtenir une répartition aussi dispersée et homogène que possible de l'inoculum de *Listeria monocytogenes* dans le fromage. Ceci est particulièrement important pour les grands fromages de p. ex. 10 kg, où le potentiel d'oxydoréduction dans le cœur diffère de celui plus près du bord du fromage. En outre, la teneur en sel au niveau du bord est généralement plus élevée que dans le cœur par la limitation de la diffusion de sel pendant le processus de saumure. Par conséquent, l'injection doit être effectuée aussi loin dans le cœur que possible et de manière aussi dispersée que possible dans le fromage. Conformément au guide technique, un niveau de contamination initial de *Listeria monocytogenes* d'environ 100 ufc par gramme de fromage. Etant donné qu'en configuration standard, un sous-échantillon d'environ 30 grammes est prélevé dans le laboratoire afin d'effectuer un dénombrement de *Listeria monocytogenes* et compte tenu du fait que ces 30 grammes sont un sous-échantillon d'un plus gros fromage individuel (boule) (p. ex. 200 à 500 grammes) qui a été initialement contaminé et conservé dans le laboratoire dans des conditions de conservation préalablement spécifiées, l'inoculation se déroulera comme suit. Supposons que nous visions une contamination initiale d'environ 100 ufc/g dans un fromage (boule) de 250 grammes. Cela signifie que l'inoculum total dans la boule de fromage devrait atteindre 25.000 ufc (100 ufc/g x 250 g). Le volume de l'inoculum ne doit pas dépasser 1 % du volume du fromage. Pour la boule de fromage de 250 grammes, l'inoculum ne peut donc pas présenter un volume de plus de 2,5 mL, mais il peut être de, p. ex., 0,5 mL (= 0,2 % en unité de masse). Dans ce cas, une culture d'un cocktail de souches de *Listeria monocytogenes* (les conditions pour la culture, le choix des souches et la réalisation du cocktail sont décrites dans le guide technique) peut être diluée jusqu'à 50.000 ufc/mL et, ensuite, par l'intermédiaire de 10 injections d'environ 2.500 ufc chacune dans 50 µL et réparties de manière régulière dans le fromage afin d'obtenir une dispersion la plus homogène possible de l'inoculum. Cet exemple de calcul montre comment gérer les exigences du guide technique pour une masse de fromage déterminée examinée avec une simulation d'une contamination dans le cœur.

Cependant, la contamination par *Listeria monocytogenes* peut également se produire à la surface du fromage par une post-contamination (surtout pendant les étapes ultérieures du processus de production, à partir, p. ex., du moule du fromage, des supports utilisés pour l'affinage des fromages, de la coupe du fromage, etc.). En outre, la surface des certains

fromages est un environnement plus favorable à la multiplication de *Listeria monocytogenes* par remontée du pH suite à l'intervention des levures, notamment. Pour la simulation d'une telle contamination, il est recommandé d'effectuer une inoculation à la surface du fromage ou à la surface de coupe du fromage. L'inoculation sur la surface totale du fromage (boule) sert à simuler une post-contamination du fromage fini. L'inoculation à la surface de coupe sert à simuler une post-contamination du fromage à la suite d'une coupe de fromage fini (p. ex. pour les grands fromages). Afin d'éviter les problèmes d'échantillonnage et obtenir des résultats suffisamment fiables, une telle inoculation peut être exécutée en répartissant l'inoculum sur la surface ou la surface de coupe du fromage. Supposons que nous visions un inoculum initial d'environ 100 ufc/g dans un fromage (boule) de 250 grammes. Cela signifie que l'inoculum total de la boule de fromage devrait atteindre 25.000 ufc (100 ufc/g x 250 g). Le volume de l'inoculum ne doit pas dépasser 1 % du volume du fromage. Pour la boule de fromage de 250 grammes, l'inoculum ne peut donc pas présenter un volume de plus de 2,5 mL, mais il peut être p. ex. de 0,5 mL (= 0,2 % en unité de masse). Dans ce cas, une culture d'un cocktail de souches de *Listeria monocytogenes* peut être diluée jusqu'à 50.000 ufc/mL et, ensuite, l'inoculum de 0,5 mL peut être totalement réparti (p. ex. étalé) sur la surface ou la surface de coupe du fromage afin d'obtenir une inoculation suffisamment homogène. L'échantillonnage de la surface doit être standardisé puisque c'est à cet endroit que la multiplication est attendue. Afin de répondre aux exigences du guide technique, il convient d'exécuter un calcul comme indiqué ci-dessus concernant les volumes et les concentrations de l'inoculum qui doit être appliqué.

Aussi pour les produits emballés sous une atmosphère modifiée ou sous vide, il est important que l'inoculum soit réparti sur toute la surface du fromage, étant donné que la concentration en sel peut être différente entre le centre et la surface du fromage. Lors d'un (ré)emballage du fromage, on doit tenir compte du rapport gaz/produit représentatif et de la composition de gaz initiale du fromage préemballé.

- c. Est-ce qu'une injection modifie les propriétés intrinsèques du fromage au niveau des zones d'injection ?

En principe, les volumes d'inoculum peuvent en effet modifier les propriétés intrinsèques au niveau des zones d'injection ou d'inoculation. Par conséquent, le guide technique prévoit une limitation du rapport entre l'inoculum et le produit qui ne peut pas dépasser 1 % de la masse (ou du volume) de l'unité de test.

En outre, il est possible d'adapter la valeur du pH et/ou de l' a_w conformément aux valeurs mesurées dans le produit. C'est potentiellement important quand il s'agit d'un fromage avec des propriétés intrinsèques qui sont à la frontière entre la croissance et la non-croissance de *Listeria monocytogenes*. Cette adaptation peut être réalisée en diluant l'inoculum avec de l'eau peptonée tamponnée (EPT) avec un pH ajusté et plus de sel jusqu'à ce que l'EPT ait un pH et une a_w correspondant aux pH et à l' a_w mesurés du fromage en question. Cet ajustement du pH et de l' a_w de l'inoculum n'est toutefois pas exigé dans le guide technique, mais selon le Comité scientifique, il doit être appliqué s'il est jugé pertinent.

- d. Quelles possibilités de contamination doivent être simulées (contamination du lait, contamination pendant ou après la production du fromage, etc.) ?

Comme indiqué au point 5.1.1.a., *Listeria monocytogenes* peut contaminer le fromage par différentes voies. Selon les cas, il est possible que les deux différents types d'inoculation du fromage avec *Listeria monocytogenes* (comme mentionnés au point 5.1.1.b.) doivent être simulés séparément, à savoir un premier test de provocation avec inoculation par injection dans le cœur du fromage et un deuxième test de provocation avec inoculation sur la surface du fromage.

Tel qu'il est indiqué au point 5.1.1.b., la voie d'inoculation est partiellement déterminée par le demandeur des tests de provocation. Il est important que le choix du type d'inoculation soit motivé par le demandeur en fonction du type de fromage, des possibilités de contamination documentées ou prévues et de l'objectif du test de provocation.

Par exemple, lorsque le producteur dispose de résultats d'analyse suffisants ou d'autres données qui montrent que la contamination par *Listeria monocytogenes* à partir de l'environnement de production est peu probable (dans la plupart des cas, cela n'est pas connu avec certitude) et donc seulement si on soupçonne qu'il y a une contamination dans le cœur, un test de provocation avec une inoculation uniquement dans le cœur du fromage est nécessaire.

Par contre, lorsque le producteur dispose de résultats d'analyse suffisants ou d'autres données qui montrent que la contamination par *Listeria monocytogenes* à partir du lait (cru) est peu probable, un test de provocation avec une inoculation sur la surface (de coupe) du fromage uniquement est nécessaire.

Il est recommandé de réaliser l'inoculation et l'échantillonnage dans le cœur et sur la surface (de coupe) du fromage lorsque les informations disponibles sur les voies de contamination de *Listeria monocytogenes* sont insuffisantes. La réalisation de deux tests de provocation distincts (une inoculation dans le cœur et l'autre, à la surface (de coupe)) permet d'obtenir plus d'informations et de savoir où se produit la croissance effective et où se trouve le plus grand potentiel de croissance pour le fromage. La réalisation de deux tests de provocation distincts n'est toutefois pas absolument nécessaire et les tests peuvent être combinés. Dans ce cas, la même portion de fromage est inoculée dans le cœur et sur la surface (de coupe) au cours du même test de provocation. Le potentiel de croissance le plus élevé dominera alors dans le résultat de ce test de provocation. Dans ce cas, le volume final total de l'inoculum sera réparti sur les deux sites d'inoculation (la moitié pour l'injection dans le cœur et l'autre moitié pour l'ensemencement de surface). Supposons que nous visions un inoculum initial d'environ 100 ufc/g dans un fromage (boule) de 250 grammes. Cela signifie que l'inoculum total dans la boule de fromage devrait atteindre 25.000 ufc (100 ufc/g x 250 g). Le volume de l'inoculum ne doit pas dépasser 1 % du volume du fromage. Pour la boule de fromage de 250 grammes, l'inoculum ne peut donc pas présenter un volume de plus de 2,5 mL, mais il peut être p. ex. de 1 mL (= 0,4 % en unité de masse). Dans ce cas, une culture d'un cocktail de souches de *Listeria monocytogenes* peut être diluée jusqu'à 25.000 ufc/mL. Ensuite, l'injection est effectuée par l'intermédiaire de 10 injections d'environ 1.250 ufc chacune dans 50 µL, réparties dans le fromage, et les 0,5 mL restant peuvent alors être répartis sur la surface ou la surface de coupe du fromage afin d'obtenir une inoculation suffisamment homogène.

- e. A quel stade de fabrication du fromage l'inoculation doit-elle intervenir (avant ou après l'affinage) ?

Ce paragraphe ne prend pas en compte le cas de l'inoculation du lait avant la préparation du fromage.

L'inoculation du fromage doit être réalisée après l'affinage du fromage le premier jour de la durée de conservation (jour 0), en d'autres termes au moment où le fromage est mis sur le marché comme denrée alimentaire prête à être consommée et dispose, éventuellement, d'une étiquette avec les conditions de conservation recommandées.

La responsabilité de la sécurité des produits incombe aux producteurs eux-mêmes. En conséquence, le choix du moment de l'inoculation doit être argumenté par le(s) producteur(s) responsable(s) de la détermination de la durée de conservation du fromage (voir point 4.2.).

- f. Un niveau de contamination initial de 10 ufc/g peut-il être utilisé pour mimer une situation plus réaliste ?

En cas de niveau de contamination initial plus faible, l'effet de la variabilité de la phase de latence⁵ des cellules individuelles peut jouer un rôle (Francois *et al.*, 2006). En effet, cette phase peut être plus courte ou plus longue en fonction des cellules et, cela étant, il convient

⁵ Au cours de la **phase de latence**, les bactéries s'adaptent aux conditions de croissance. Il s'agit de la période pendant laquelle les bactéries individuelles se développent, mais ne sont pas encore en état de se multiplier. Selon le stress préalable subi par les bactéries, la phase de latence peut être plus longue ou plus courte.

de répéter plusieurs fois l'essai afin d'obtenir un résultat fiable en ce qui concerne l'estimation du potentiel de croissance afin de compenser cette variabilité. Selon Francois *et al.* (2006), au minimum 1.000 cellules doivent être appliquées par portion à échantillonner pour minimiser la variabilité des cellules individuelles. Lorsqu'un échantillon de 100 grammes est inoculé, il est en principe possible de travailler avec un niveau de contamination initial de 10 ufc/g. Cependant, le Comité scientifique recommande de viser un niveau de contamination initial de 100 ufc/g, comme aussi recommandé dans le guide technique, également parce que le dénombrement de *Listeria monocytogenes* ne peut pas être effectué de manière suffisamment précise avec de nombres inférieurs à 100 ufc/g.

En cas de niveau d'inoculation trop élevé, l'agent pathogène peut éventuellement être en position dominante et provoquer ainsi des interférences avec les microflores naturellement présentes dans le fromage, une situation qui rend les résultats non pertinents.

Par conséquent, le niveau de contamination initial exigé dans le guide technique est fixé à environ 100 ufc/g. La note de service de l'AFSCA tolère une marge de 50 ufc/g pour ce niveau de contamination initial et, par conséquent, le niveau de contamination initial peut être compris entre 50 et 150 ufc/g. Cependant, lors du comptage de faibles nombres, il est connu que l'incertitude de mesure d'une méthode de dénombrement représente un facteur d'environ 3 lorsque le résultat de l'analyse est exprimé en nombres absolus. Cela signifie qu'un résultat de mesure d'environ 100 ufc/g se situera probablement entre environ 30 ufc/g et 300 ufc/g lors d'une analyse en double. Un niveau d'inoculation déterminé et à atteindre de 100 ufc/g implique donc déjà une marge.

- g. En sachant que le niveau de contamination initial est le facteur qui influe le plus sur le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes*, est-ce qu'un potentiel de croissance supérieur à 0,5 unités log est le même pour un niveau de contamination initial de 100 ufc/g et pour un niveau de contamination initial de 10 ufc/g ?

Le potentiel de croissance est déterminé par la phase de latence et le taux de croissance. Le niveau de contamination initiale a une influence sur la phase de latence observée mais pas sur le taux de croissance observé. Cette influence est uniquement pertinente lorsque le niveau de contamination initiale est faible comme mentionné ci-dessus et non pour un niveau de contamination initial comme mentionné dans le guide technique (100 ufc/g). Pour des tels niveaux de contamination relativement élevés (de 100 ufc/g), on peut supposer qu'il y a toujours au moins quelques cellules présentes qui se divisent à une vitesse correspondant aux conditions physico-chimiques (température, pH, etc.) et qui se comportent donc comme les cellules se divisant le plus rapidement. A de faibles niveaux de contamination, il est possible que, par hasard, il n'y ait pas de cellules se divisant plus rapidement et donc une cellule avec une vitesse de division plus faible déterminera la phase de latence observée et ensuite le taux de croissance. On peut donc s'attendre à ce que le potentiel de croissance observé, à partir d'un nombre de cellules plus élevé, sera plutôt une faible surestimation (mais inconnue) du potentiel de croissance à partir d'un nombre plus faible. Cela a été démontré dans une publication de François *et al.* (2006) pour la comparaison de la croissance des niveaux de contamination de 10 à 10.000 cellules par 15 gramme de paté. Østergaard *et al.* (2015) ont utilisé une approche différente (le RLT ou *Relative Lag Time concept* pour des cellules individuelles de *Listeria monocytogenes*) et ont trouvé une bonne concordance entre leur prédiction du modèle et les résultats des tests à un niveau de contamination initial aussi bas que 0,4 - 1 ufc/g dans le *cottage cheese*.

En résumé, un potentiel de croissance de > 0,5 unités log estimé à un niveau de contamination initial de 100 ufc/g n'est pas, sur base des connaissances actuelles, considéré comme significativement différent par rapport à un potentiel de croissance attendu à un niveau de contamination initial de 10 ufc/g.

Le taux de croissance de *Listeria monocytogenes* dans les denrées alimentaires est affecté par les propriétés intrinsèques du produit (pH, a_w , teneur en sel), la température de conservation, l'atmosphère de conditionnement, le nombre et la composition de la microflore associée (entre autres les bactéries lactiques) et la souche de *Listeria monocytogenes*. C'est

la raison pour laquelle le guide technique a défini qu'une bonne description des propriétés intrinsèques du produit est nécessaire, que les conditions de conservation du produit doivent être établies, qu'il convient d'utiliser des souches de *Listeria monocytogenes* bien caractérisées pour le cocktail en vue de l'inoculation, lesquelles souches doivent être développées d'une manière standardisée, et qu'il est recommandé d'exécuter le test de provocation sur trois lots différents du même type de produit afin de tenir compte de la variabilité de propriétés du produit lors de la détermination du potentiel de croissance.

- h. Peut-on utiliser un potentiel de croissance supérieur à 0,5 unités log pour déterminer la durée de conservation finale de *Listeria monocytogenes* et pour déterminer une valeur limite intermédiaire, pour laquelle le critère de 100 ufc/g est respecté ?

Si le potentiel de croissance est déterminé comme l'indique le guide technique, il peut servir à déterminer une valeur limite intermédiaire le premier jour de la durée de conservation (lorsque le produit est prêt à être mis sur le marché). Il est demandé aux laboratoires d'utiliser le tableau 2 pour l'interprétation d'un résultat de potentiel de croissance obtenu lors d'un test de provocation effectué selon le guide technique, cela afin de tenir compte de l'incertitude de mesure (voir la note de service de l'AFSCA).

Tableau 2. Valeurs de tolérance de *Listeria monocytogenes* le jour 0 sur base du potentiel de croissance d'un test de provocation réalisé selon le guide technique.

\bar{d} calculé selon le protocole européen	Valeur de tolérance Le « jour 0 » (critère microbiologique)
Entre - 1,00 et 0,00	< 100/g
Entre 0,00 et 0,49	< 100/g
Entre 0,50 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
> 2,99	Absence dans 25 g

Ce potentiel de croissance ne peut toutefois pas être utilisé pour déterminer la durée de conservation finale étant donné qu'une durée de conservation a déjà été déterminée avant le début du test de provocation. Si on souhaite néanmoins déterminer la durée de conservation finale, il convient d'effectuer des tests de provocation pour lesquels on détermine le taux de croissance maximal (voir la section 3.2.2 du guide technique). Sur base des résultats de ces tests, il est alors possible de déterminer une durée de conservation présumée, où le critère de 100 ufc/g est respecté pour un niveau de contamination initial donné.

- i. Les tests de provocation avec *Listeria innocua* sont-ils acceptés et si oui, où faut-il se procurer cette souche ?

Les tests de provocation doivent de préférence être effectués avec des souches de *Listeria monocytogenes* bien caractérisées comme il est indiqué dans le guide technique et non avec des souches de *Listeria innocua*. A l'échelle pilote, on peut effectuer des tests avec *Listeria innocua* comme souche de substitution à *Listeria monocytogenes*, pour lesquelles le processus de production est également validé (voir point 4.1.) préalablement au test de provocation proprement dit, pour évaluer le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* pendant la durée de conservation. Quand on opte pour *Listeria innocua*, les souches doivent être suffisamment caractérisées et il convient de prouver que ces souches de *Listeria innocua* partagent des caractéristiques de croissance semblables avec *Listeria monocytogenes*. Cependant, l'utilisation de *Listeria monocytogenes* correspond mieux à la situation réelle.

5.1.2. Mesures du pH et de l'a_w

A quel moment et sur combien d'échantillons en provenance de combien de lots convient-il de mesurer le pH et l'a_w, sachant que ces paramètres évoluent en fonction de la durée de conservation du fromage et combien de fois convient-il de répéter l'opération ?

Le pH et l'a_w peuvent évoluer de manière significative surtout pendant l'affinage du fromage. Selon le guide technique, il convient d'effectuer l'inoculation après l'affinage du fromage au moment où le fabricant estime que son produit peut être mis sur le marché. Après l'affinage, une évolution moins forte du pH et de l'a_w est attendue. Cependant, le pH et l'a_w peuvent varier entre différents lots du même type de fromage et surtout entre les différentes parties du fromage, le cœur, la surface, les arêtes ou les coins du fromage (Lahou & Uyttendaele, 2015). C'est la raison pour laquelle le guide technique recommande de mesurer le pH et l'a_w au jour 0 (premier jour du test de provocation) et à la fin prévue de la durée de conservation (dernier jour du test de provocation). Ces mesures doivent avoir lieu une fois sur une seule unité de test par lot tant au jour 0 qu'au dernier jour de la durée de conservation. Cela doit être fait dans le cœur et/ou sur la surface du fromage, selon le site d'inoculation. Des méthodes ISO peuvent être utilisées pour mesurer le pH et l'a_w. Pour le pH, la norme ISO 2917:1999 peut être utilisée (« Meat and meat products - Measurement of pH - Reference method ») et pour l'a_w, la norme ISO 21807:2004 (« Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Determination of water activity » - confirmed in 2014). Compte tenu de la limitation dans le champ d'application actuel, il est recommandé d'évaluer la méthode ISO pour mesurer le pH en vue de l'application aux produits laitiers. Il est également recommandé que la performance de la méthode ISO horizontale pour mesurer l'a_w particulièrement pour mesurer l'a_w soit suffisamment vérifiée dans les produits laitiers.

En outre, le Comité scientifique recommande de déterminer aux mêmes moments les teneurs en sel et en matière sèche afin de caractériser le type de fromage. D'autres caractéristiques visuelles peuvent également être suivies (p. ex. : fromage à croûte fleurie, fissures dans la croûte, odeurs, onctuosité différentes, etc.).

5.1.3. Analyses microbiologiques

- a. Sur combien d'échantillons en provenance de combien de lots convient-il d'effectuer les analyses microbiologiques ?

Le guide technique indique que les dénombrements et les détections de *Listeria monocytogenes* doivent être effectuées au jour 0 (le premier jour de la durée de conservation, en d'autres termes le jour où le produit est prêt à être commercialisé) et au dernier jour de la durée de conservation comme déterminé par le(s) producteur(s) responsable(s) sur trois unités de test par lot. Le nombre de lots à tester doit être déterminé sur base d'un module qui marque la limite entre la croissance et la non-croissance ou à l'aide d'un calculateur qui calcule la variabilité entre les lots (voir point a. au point 3.2.1.2 du guide technique).

- b. Quelle est la finalité d'autres analyses microbiologiques telles que le dénombrement de germes totaux à 22 °C, de la flore lactique, de levures, etc. et comment doivent-elles être interprétées ?

Un dénombrement des germes totaux à 22 °C n'est pas pertinent pour les fromages. Le fromage est un produit fermenté et une haute teneur en germes est toujours attendue en raison de la présence d'un nombre élevé de bactéries lactiques qui sont soit ajoutées comme culture 'starter', soit présentes naturellement comme ferments. Pour les fromages à pâte molle, mi-molle et mi-dure, le nombre de bactéries lactiques est de l'ordre de 5 à 9 log ufc/g (Lahou & Uyttendaele, 2015). Il est possible que le développement de bactéries lactiques, en tant que composant de la microflore associée, à des taux élevés limite le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* (Montel *et al.*, 2014 ; Ross *et al.*, 2000).

La détermination des levures et des moisissures n'est pas pertinente pour les fromages. Les moisissures peuvent être évaluées visuellement. Leur présence est normale dans les fromages bleus, mais elle est un signe d'altération pour d'autres fromages.

La détermination des *E. coli* et des staphylocoques à coagulase positive peut être intéressante afin d'évaluer la qualité microbiologique générale du type de fromage et du lot correspondant mais ces paramètres n'interfèrent pas avec la multiplication de *Listeria monocytogenes*.

5.1.4. Durée et température de conservation

Quelles sont les recommandations pour la température et la durée de conservation ou les autres facteurs importants à prendre en considération ?

Les recommandations pour la durée et la température de conservation sont indiquées dans le tableau 3 (voir tableau 3 du guide technique).

Tableau 3. Diagramme de flux des conditions de conservation (incubation)

Stage of cold chain	Storage (incubation) temperature			Storage (incubation) duration			
				Shelf life ≤ 21 days		Shelf life > 21 days	
From the manufacture until the arrival to the display cabinet	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	8°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	7 days
Retail: Display cabinet	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	12°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	½ (shelf life – 7 days)
Consumer storage	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	12°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	½ (shelf life – 7 days)

* Temperature justified by detailed information: the 75th percentile of the observations for the country where the stage of the cold chain is located.

Comme indiqué dans le tableau 3, trois stades doivent être pris en compte en ce qui concerne la durée et la température de conservation des tests de provocation.

Au stade du producteur et jusqu'à l'arrivée au commerce de détail, le choix de la température et de la durée doit être motivé par le producteur ou, si l'information est manquante, la température doit être de 8 °C et la durée équivalente à un tiers de la durée de conservation totale si elle est ≤ 21 jours ou de 7 jours si la durée de conservation totale est > 21 jours.

Au stade du comptoir du commerce de détail, le choix de la température et de la durée doit être motivé par le producteur ou, si l'information est manquante, la température doit être de 12 °C et la durée équivalente à un tiers de la durée de conservation totale si elle est ≤ 21 jours, ou à la moitié de la durée de conservation totale – 7 jours si elle est > 21 jours.

Au stade de la conservation chez le consommateur, le choix de la température et de la durée doit être motivé par le producteur ou, si l'information est manquante, la température doit être de 12 °C et la durée équivalente à un tiers de la durée de conservation totale si elle est ≤ 21 jours, ou à la moitié de la durée de conservation totale – 7 jours si elle est > 21 jours. Selon le guide technique et selon divers avis de l'EFSA, le 75^e percentile du nombre d'observations des températures des réfrigérateurs domestiques dans un pays particulier tient suffisamment compte des abus de température de conservation par les consommateurs.

En ce qui concerne la situation belge, la température de conservation légale au détail, comme mentionné dans l'arrêté royal du 13 juillet 2014 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires,

est ≤ 7 °C⁶. L'annexe 1 reprend le pourcentage des non-conformités des inspections concernant les « températures des produits réfrigérés et des produits surgelés à respecter » dans le secteur de la distribution pour la période 2013-2015. Une non-conformité signifie que la température mesurée dans le produit est supérieure à la température légalement requise ou que le produit n'est pas conservé au réfrigérateur alors que c'était une obligation légale. L'annexe 1 montre que 8,67 % des 64.744 contrôles n'étaient pas conformes. Etant donné que le pourcentage des conformités est supérieur à 90 %, l'utilisation de la température de conservation de 7 °C pour le fromage dans le secteur de la vente au détail est justifiée dans les tests de provocation.

En ce qui concerne la température de conservation chez le consommateur, on peut utiliser, selon la note de service de l'AFSCA, une température de conservation de 7 °C. Cette température concerne le 75^e percentile du nombre d'observations de la température dans les réfrigérateurs domestiques en Belgique qui ont été réalisées dans le cadre de l'enquête sur la consommation alimentaire menée en 2004 par l'ISP⁷. Dans un rapport de l'ISP⁸, on constate toutefois que la température moyenne des réfrigérateurs est de 7,2 °C, avec un intervalle interquartile allant de 5 à 9 °C. Cela signifie que le 75^e percentile est de 9 °C.

5.1.5. Extrapolation des résultats

Dans quelle mesure les résultats des tests de provocation sont-ils extrapolables à d'autres fromages du même type ou d'autres types ?

Dans le guide de la Commission européenne, on peut lire ce qui suit :

- « Les produits doivent présenter les mêmes caractéristiques (pH, a_w , teneur en sel, concentration en conservateurs, système d'emballage, microflore associée ou toute autre caractéristique importante pour la survie et le développement de *Listeria monocytogenes*) afin que les études soient valables pour ces produits. Si une ou plusieurs caractéristiques sont différentes, les études ne peuvent pas être utilisées sans que l'effet de ces caractéristiques différentes sur la survie et le développement de *Listeria monocytogenes* soit évalué ;
- La recette du produit doit être identique et, dans le cas contraire, les ingrédients doivent faire l'objet d'une évaluation pour déterminer leur effet sur le développement de *Listeria monocytogenes* ;
- Le processus de production des produits doit être similaire. Les étapes de ce processus doivent être comparées en détail, et il convient de déterminer l'effet de toute différence dans les processus sur la survie et le développement. Les études doivent tenir compte de la variabilité inhérente liée au produit ;
- Les conditions d'entreposage et la durée de conservation doivent être similaires et dans le cas contraire, l'effet des différences sur le développement de *Listeria monocytogenes* doit être évalué, et
- La microflore associée (cultures de démarrage) doit être identique et, sinon, avoir le même effet sur *Listeria monocytogenes*. »

La recherche scientifique montre qu'il existe une grande variabilité de comportement de *Listeria monocytogenes* à la fois entre les divers types de fromages à pâte molle et mi-dure et entre les différents lots du même type de fromage (Lahou & Uyttendaele, 2015). La classification des fromages (et surtout les fromages à pâte molle et mi-dure) en différents types avec un potentiel de croissance escompté similaire de *Listeria monocytogenes* n'est pas facile. En effet, les paramètres qui influent sur la croissance potentielle de *Listeria monocytogenes* sont fort variables. Et ce, étant donné que les fromages sont des produits fermentés et qu'ils peuvent donc moins faire l'objet de normalisation ou de contrôle des propriétés que d'autres produits ayant une durée de conservation plus longue et qui sont

6

http://www.Warenwetgeving.be/modules/search_div.phtml?ID_Parent=72;ID=145;type=d;start=0;MaxLines=10;fulltextmode=title;showAbolished=nee

⁷ <https://www.wiv-isp.be/epidemiologie/foodfr/table04.htm>

⁸ <https://www.wiv-isp.be/epidemiologie/epinl/foodnl/food04nl/foodsynl.pdf>

conservés réfrigérés comme p. ex. des produits cuits à base de viande, les salades à tartiner, le poisson fumé, etc.

Les paramètres intrinsèques les plus pertinents pour le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* sont le pH, l' a_w (entre autres liée à la teneur en sel), la teneur en eau, la nature et la quantité de flore associée au niveau interne et sur la croûte (tantensemencée que nonensemencée comme culture 'starter' (compétition pour les nutriments, composants antimicrobiens, etc.)), la nature du lait (origine, traitement thermique, etc.) et la texture du fromage. Ces paramètres caractéristiques finaux résultent du processus de production qui comprend l'affinage du fromage. Les paramètres extrinsèques les plus pertinents pour le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* au cours de l'affinage et du stockage du fromage sont la température, l'humidité relative de l'air et la composition des gaz dans le conditionnement.

Les fromages peuvent être classés de différentes manières. La Commission du Codex Alimentarius utilise en premier lieu une désignation du fromage en fonction de sa dureté, ensuite sur base de sa teneur en matières grasses et enfin sur base des caractéristiques de l'affinage (voir annexe 2). Dans ce contexte, il semble que le classement le plus pertinent soit basé sur la technologie de la préparation et de l'affinage, qui se traduit par différentes propriétés intrinsèques du fromage (y compris, dans un premier temps, la classification fondée sur la consistance du fromage) et donc par différentes possibilités de survie, de croissance ou d'inactivation de *Listeria monocytogenes* tant pendant la production et l'affinage que pendant la conservation. On peut y intégrer la matière première de départ, à savoir l'espèce animale dont le lait ou le petit-lait provient, la teneur en matières grasses du lait, le fait qu'il s'agit de lait cru ou chauffé, etc. Ces facteurs sont certainement pertinents en ce qui concerne l'éventuelle présence et le comportement de *Listeria monocytogenes*. Aucune prescription n'existe pour le saumurage (sec ou en saumure) et donc sur la teneur finale en sel dans le fromage.

L'annexe 3 présente une proposition de classement des fromages. Le Comité scientifique estime que les résultats des tests de provocation peuvent être extrapolés aux lots d'un même type de fromage comme déterminé par les caractéristiques similaires pour les facteurs repris à l'annexe 3.

Lorsque le type de fromage change en raison d'une modification d'au moins un des facteurs mentionnés ci-dessus qui modifient les propriétés des fromages, les résultats des tests de provocation ne peuvent plus être utilisés et, dans ce cas de figure, une nouvelle validation est nécessaire avec de nouveaux tests de provocation.

5.2. Tests de vieillissement pour *Listeria monocytogenes* dans le fromage

5.2.1. Alternative à un test de provocation

Dans quelle mesure un test de vieillissement de *Listeria monocytogenes* dans le fromage peut-il servir comme alternative à un test de provocation ?

Les tests de vieillissement ont l'avantage qu'ils peuvent mieux reproduire la réalité car il s'agit d'une contamination naturelle. Dans le cas d'un test de vieillissement, le niveau de contamination initial sera peut-être inférieur au niveau de contamination initial visé avec un test de provocation et il est, par conséquent, nécessaire de répéter plusieurs fois l'opération pour réduire l'incertitude liée à la variabilité de la phase de latence des cellules individuelles, et donc également le potentiel de croissance observé. Cependant, il y a deux options pour effectuer et interpréter des tests de vieillissement :

1. L'option 1 permet d'utiliser des tests de vieillissement en vue de collecter des données historiques qui démontrent que la sécurité alimentaire du fromage est assurée pour le consommateur jusqu'à la fin de la durée de conservation. Ces tests de vieillissement s'inscrivent davantage dans la vérification de la gestion systématique de la sécurité alimentaire (Zwietering *et al.*, 2016). Dans ce cas, des analyses seront effectuées sur différents lots d'un type spécifique de fromage, un

certain nombre d'unités par lot étant soumis à un échantillonnage et à une analyse (**le nombre d'unités est examiné plus loin au point 5.2.5.**, qui explique aussi la règle $n/N < 10 \%$). Dans ce contexte, comme le décrit le guide technique (point 4.3), des analyses (dénombrement de *Listeria monocytogenes*) ne sont effectuées qu'à la fin de la durée de conservation. Dans ce cas, on s'attend à ce que la grande majorité des lots ne soient pas contaminés par *Listeria monocytogenes*. Ces analyses sont donc plutôt adaptées pour établir un *track record* selon lequel la probabilité de rencontrer des nombres plus élevés de *Listeria monocytogenes* (≥ 100 ufc/g) dans un lot à la fin de la durée de conservation est faible. Etant donné que, dans ce cas de figure, aucune analyse n'intervient au jour 0 de la durée de conservation, ces tests de vieillissement ne permettent pas d'évaluer le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes*.

2. L'option 2 permet d'utiliser des tests de vieillissement de lots spécifiques où, dans le cadre d'une analyse préalable d'une ou de plusieurs unités du lot, une contamination naturelle du fromage par *Listeria monocytogenes* par 25 grammes a été constatée. Le Comité scientifique est d'avis qu'un test de vieillissement sur un tel lot contaminé naturellement avec prélèvement d'échantillon et analyse tant au jour 0 (ou au début de la durée de conservation après la constatation de la contamination par *Listeria monocytogenes*) qu'à la fin de la durée de conservation, peut servir d'alternative à un test de provocation. Et ce, pour autant qu'au jour 0 et à la fin de la durée de conservation, un nombre suffisant d'unités du lot soient soumises à des analyses microbiologiques pour la détection ou le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. **Les exigences à cet égard sont expliquées plus en détail au point 5.2.3.** Comme il est également indiqué au point 5.1.5., le Comité scientifique est d'avis que les résultats des tests de vieillissement ne peuvent être extrapolés qu'aux lots du même type de fromage.

5.2.2. Les mesures de pH et d' a_w

A quel moment et sur combien d'échantillons en provenance de combien de lots convient-il de mesurer le pH et l' a_w , sachant que ces paramètres évoluent en fonction de la durée de conservation du fromage et combien de fois faut-il procéder à l'opération ?

A ce niveau, les mêmes exigences que celles des tests de provocation s'appliquent (voir point 5.1.2.). Cela doit être réalisé dans le cœur et/ou sur la surface du fromage, selon la voie de contamination la plus probable.

5.2.3. Analyses microbiologiques

Sur combien d'échantillons en provenance de combien de lots convient-il d'effectuer les analyses microbiologiques ?

Dans le cas de l'option 1 mentionnée au point 5.2.1., cinq échantillons aléatoires peuvent par exemple être analysés pendant un an dans un nombre suffisant de lots afin de déterminer la quantité de *Listeria monocytogenes* à la fin de la durée de conservation. Ces résultats peuvent être utilisés pour démontrer la garantie systématique de la sécurité alimentaire pendant la durée de conservation donnée et selon les conditions de conservation associées.

Quand un lot est positif à *Listeria monocytogenes*, on peut utiliser des tests de vieillissement comme décrit dans l'option 2 mentionnée au point 5.2.1. Le stress préalable et l'insertion des souches de *Listeria monocytogenes* refléteront mieux la réalité dans ces conditions naturelles. Cependant, les échantillons naturellement contaminés comprennent généralement de faibles nombres de *Listeria monocytogenes* (< 50 ufc/g) et les conditions moins contrôlées (contamination plus hétérogène) conduisent à une variabilité plus élevée des résultats de l'observation du potentiel croissance (Francois *et al.*, 2006). Par conséquent, il est recommandé, dans le cadre de tels tests de vieillissement, de prélever et d'analyser environ 30 échantillons du lot naturellement contaminé au moyen de dénombrements (ou dans le cas d'un faible nombre (< 50 ufc/g) à l'aide de la méthode d'estimation du nombre le plus probable (méthode MPN)) au début et à la fin de la durée de conservation, au lieu de 3

comme c'est le cas avec les échantillons inoculés artificiellement (avec environ 100 ufc/g *Listeria monocytogenes*) dans les tests de provocation.

Si des tests de vieillissement telles que mentionnés dans l'option 2 ont été effectués pour un type particulier de fromage et ceci avec trois lots différents naturellement contaminés sur une période maximale couvrant les trois dernières années, et qu'un minimum de 30 échantillons par lot ont été analysés au début et à la fin de la durée de conservation, les résultats de ces tests de vieillissement peuvent alors être extrapolés aux autres lots du même type de fromage (voir annexe 3). Ces tests de vieillissement avec des échantillons contaminés naturellement peuvent éventuellement se limiter à un lot si cela est justifié – comme pour les tests de provocation avec des lots inoculés artificiellement – sur base d'un module de limite entre la croissance et la non-croissance ou sur base d'un calculateur qui calcule la variabilité entre les lots concernés d'un certain type de fromage (voir point a. au point 3.2.1.2 du guide technique).

Si moins de trois (ou le nombre obtenu via le module ou le calculateur, voir plus haut) tests de vieillissement ont été effectués, il convient alors de suivre l'option 1 en ce qui concerne les tests de vieillissement ou de choisir de procéder à des tests de provocation complémentaires (avec des échantillons inoculés artificiellement) sur d'autres lots (avec prise d'échantillons et analyse sur 3 unités de test par lot). Ceci dans le but que le nombre de tests de provocation en combinaison avec le nombre de tests de vieillissement (option 2 avec lot contaminé naturellement) soit au total de trois (ou le nombre obtenu via le module ou le calculateur, voir ci-dessus), afin que les résultats puissent être extrapolés à d'autres lots du même type de fromage.

5.2.4. Durée et température de conservation

Quelles sont les recommandations pour la température et la durée de conservation ou les autres facteurs importants à prendre en considération ?

A ce niveau, les mêmes exigences que celles des tests de provocation s'appliquent (voir le point 5.1.4.).

5.2.5. Interprétation du guide technique

- a. Comment faut-il interpréter la règle $n/N < 10\%$ et l'interprétation de plus de 10 échantillons sur un lot de 100 paquets/unités est-elle correcte ?

Cette règle est extraite du livre de Michel Lejeune intitulé « Statistique. La théorie et ses applications » (2^{ème} édition, 2010). Dans le cas des tests de vieillissement, il s'agit d'un échantillon aléatoire simple pour lequel chaque élément a une chance égale d'être sélectionné hors de la population et pour lequel les éléments ne sont pas mutuellement interchangeables. Afin de répondre à ces exigences, la taille de la population (N) doit être suffisamment grande et la taille de l'échantillon (n) doit être $< 10\%$ de la taille de la population. En outre, il convient de prélever un nombre d'échantillons suffisant pour obtenir un intervalle de confiance acceptable.

L'interprétation de plus de 10 échantillons sur un lot de 100 paquets n'est pas correcte. Selon la règle, moins de 10 échantillons sur un lot de 100 paquets est une interprétation correcte.

Sur base de cette règle, le degré de garantie de la sécurité alimentaire d'un lot peut être déterminé, mais il n'est pas possible de démontrer si *Listeria monocytogenes* peut, si présente, se développer dans le fromage ou pas. Pour ce dernier point, nous renvoyons le lecteur au point 5.2.3 (option 1 des tests de vieillissement). Les résultats peuvent toutefois servir de données historiques à l'appui de la démonstration des bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène (GMP et GHP), du respect des principes fondés sur le HACCP pour la garantie de la sécurité alimentaire et de la détermination adéquate des conditions de conservation. Ces tests de vieillissement sont donc à envisager plutôt comme une vérification continue de la mise en œuvre des systèmes de gestion de la sécurité alimentaire (Zwietering *et al.*, 2016).

- b. Comment faut-il interpréter le tableau concernant les valeurs p et les intervalles de confiance, et dans quels cas les risques sont-ils évalués comme étant faibles ou élevés ?

Ce tableau sert à évaluer le risque lié à un lot inconnu sur la santé publique. Selon la règle $n/N < 10 \%$, il convient de sélectionner un nombre adéquat d'unités de test à analyser (n). Selon le nombre d'unités de test analysées avec plus de 100 ufc de *Listeria monocytogenes* par gramme (r), on peut calculer la proportion estimée d'unités avec plus de 100 ufc de *Listeria monocytogenes* par gramme pour l'ensemble de la population (P) avec un intervalle de confiance correspondant. De cette façon, on obtient une estimation quantitative du risque du lot échantillonné. Il incombe à l'opérateur de démontrer que le risque en matière de sécurité alimentaire de son produit peut être considéré comme acceptable pour la santé humaine dans le contexte de la vérification de son système de gestion de la sécurité alimentaire fondé sur les GMP, GHP et les principes HACCP.

6. Conclusion

Listeria monocytogenes peut contaminer le fromage par différentes voies de contamination. Le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* peut être étudié au moyen de tests de provocation et/ou de tests de vieillissement. La contamination initiale du fromage par *Listeria monocytogenes* peut provenir du lait (cru) utilisé pour la fabrication du fromage, de l'environnement de production (équipement, outils, infrastructures, etc.) ou du personnel impliqué dans la production, la maturation, l'affinage, la coupe et le conditionnement du fromage.

Une contamination provenant du lait (cru) peut être simulée par une inoculation du lait utilisé pour la production de fromage (via une étude pilote) ou par une inoculation dans le cœur du fromage. Le choix de la méthode de l'inoculation artificielle de *Listeria monocytogenes* (inoculation dans le cœur et/ou à la surface (de coupe) du fromage) dépend de la voie de contamination la plus probable, qui dépend du type de fromage, des propriétés physicochimiques, du processus de production du fromage et de l'objectif du client. L'inoculum peut éventuellement modifier les propriétés intrinsèques du produit au niveau des zones d'injection. Il est donc indiqué dans le guide technique que le rapport entre l'inoculum et le produit ne peut pas dépasser 1 % de la masse (ou du volume) de l'unité de test. Conformément au guide technique, l'inoculation doit être effectuée après affinage du fromage, le premier jour de la durée de conservation (jour 0), autrement dit, au moment où le fromage est commercialisé comme denrée alimentaire prête à être consommée. Eventuellement, le fromage porte une étiquette spécifiant les conditions de conservation recommandées. Conformément au guide technique, le niveau initial de contamination doit être égal à environ 100 ufc (unités formant colonie)/g. Un potentiel de croissance de $> 0,5$ unités log estimé à un niveau de contamination initial de 100 ufc/g n'est pas considéré comme significativement différent par rapport à un potentiel de croissance attendu à un niveau de contamination initial de 10 ufc/g. Les tests de provocation doivent de préférence être effectués avec des souches de *Listeria monocytogenes* bien caractérisées comme il est indiqué dans le guide technique et non avec des souches de *Listeria innocua*.

Tant pour les tests de provocation que pour les tests de vieillissement, il convient de procéder aux mesures du pH et de l' a_w au jour 0 et à la date limite de consommation, une fois sur un échantillon par lot. Celles-ci doivent être réalisées dans le cœur et/ou sur la surface du fromage, au niveau du site d'inoculation pour un test de provocation ou selon la voie de contamination la plus probable pour un test de vieillissement. Les recommandations en matière de durée et de température de conservation sont quant à elles indiquées dans le tableau 3 du guide technique et sont en outre expliquées dans la note de service de l'AFSCA. Les résultats des tests de provocation et des tests de vieillissement sont extrapolables uniquement à des lots du même type de fromage. Des tests de vieillissement peuvent servir comme alternative aux tests de provocation, si un nombre d'analyses suffisant est réalisé tant au jour 0 qu'au dernier jour de la durée de conservation.

7. Recommandations

Compte tenu de l'hétérogénéité possible dans les produits fermentés artisanaux tels que les fromages à pâte molle et mi-dure fabriqués à partir de lait cru ou pasteurisés, il apparaît qu'une estimation du potentiel de croissance avec des tests de provocation laisse persister une certaine probabilité résiduelle que la croissance dans d'autres lots de fromage ou dans des fromages avec des propriétés similaires soit, dans une certaine mesure, sous-estimée ou surestimée. Pour l'évaluation du risque résultant de la présence de *Listeria monocytogenes* dans le fromage, les tests de provocation et les tests de vieillissement constituent des moyens, mais ne sont pas la seule manière de limiter le risque et ne permettent donc pas de réduire à eux seuls le risque à zéro. Par conséquent, il est important de travailler de manière préventive et hygiénique, de respecter le mieux possible la chaîne du froid et d'éviter des contaminations croisées par *Listeria monocytogenes*. A l'aide des GMP et GHP, on doit s'employer à obtenir l'absence de *Listeria monocytogenes* dans le fromage.

Il est recommandé de fournir plus d'éclaircissements sur les sujets suivants dans le guide technique de l'EURL *Lm* :

- les modalités de réalisation de tests de provocation sur des produits fermentés,
- l'échantillonnage d'un produit inoculé à la surface ou dans le cœur;
- la nécessité ou non d'adapter le pH et l' a_w d'un inoculum,
- le nombre de tests de vieillissement des lots contaminés naturellement qui est exigé pour remplacer les tests de provocation afin d'obtenir une harmonisation au niveau européen, et
- les modalités de l'inoculation et de l'échantillonnage.

Le champ d'application de la méthode ISO pour mesurer le pH doit être étendue aux produits laitiers et la méthode ISO pour mesurer l' a_w a besoin d'une évaluation spécifique concernant les caractéristiques de performance pour les produits laitiers.

Enfin, le Comité scientifique recommande d'effectuer des recherches consacrées à :

- la différence entre l'effet d'une contamination naturelle et celui d'une inoculation artificielle de *Listeria monocytogenes* sur le comportement de cet agent pathogène dans et sur différents types de fromages,
- l'influence des différents types de cultures 'starter' sur le comportement de *Listeria monocytogenes* dans un type particulier de fromage, et
- l'influence des paramètres physico-chimiques sur le potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* dans et sur les fromages afin de rendre possible l'extrapolation des résultats de tests de provocation et des tests de vieillissement à un plus grand nombre de types de fromages.

Pour le Comité scientifique,
Le Président,

Prof. Dr. E. Thiry (Sé.)

Bruxelles, le 01/03/2016

Références

Ceuppens, S., Van Boxtael, S., Westyn, A., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2015. The heterogeneity in the type of shelf life label and storage instructions on refrigerated foods in supermarkets in Belgium and illustration of its impact on assessing the *Listeria monocytogenes* threshold level of 100 CFU/g. *Food Control* 59, 377-385.

EFSA, 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal* 11(6), 3241. Disponible en ligne: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3241.pdf.

Francois, K., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Nadal, P., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2006. Single cell variability of *L. monocytogenes* grown on liver pâté and cooked ham at 7 °C: comparing challenge test data to predictive simulation. *Journal of Applied Microbiology* 100, 800-812.

Lahou, E., Uyttendaele, M., 2015. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in soft, semi-soft and semi-hard artisanal cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, submitted for publication.

Montel, M., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177, 136-54.

Østegaard, N. B., Christiansen, L. E., Dalgaard, P., 2015. Stochastic modelling of *Listeria monocytogenes* single cell growth in cottage cheese with mesophilic lactic acid bacteria from aroma producing cultures. *International Journal of Food Microbiology* 204, 55-65.

Ross, R., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G., Coffey, A., 2000. Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science and Technology* 11, 96-104.

Rückerl, I., Muhterem-Uyar, M., Muri-Klinger, S., Wagner, K. H., Wagner, M., Stessl, B., 2014. *L. monocytogenes* in a cheese processing facility: Learning from contamination scenarios over three years of sampling. *International Journal of Food Microbiology* 17, 189-198.

Schoder, D., Strauß, A., Szakmary-Brändle, K., Wagner, M., 2015. How safe is European Internet cheese? A purchase and microbiological investigation. *Food Control* 54, 225-230.

SciCom, 2015. Avis 02-2015 du Comité scientifique de l'AFSCA sur l'évaluation des risques microbiologiques de la consommation des produits laitiers à base de lait cru (dossier SciCom 2014/06: auto-saisine). Disponible en ligne: http://www.favy-afsca.fgov.be/comitescientifique/avis/_documents/AVIS02-2015_FR_DOSSIER_2014-06.pdf.

Van Boxtael, S., Devlieghere, F., Berkvens, D., Vermeulen, A., Uyttendaele, M., 2014. Understanding and attitude regarding the shelf life labels and dates on pre-packed food products by Belgian consumers. *Food Control* 37, 85-92.

Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M., Herman, L., 2015. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal* 50, 32-44.

Zwietering, M. H., Jacxsens, L., Membré, J.-M., Nauta, M., Peterz, M., 2016. Relevance of microbial finished product testing in food safety management. *Food Control* 60, 31-43.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants:

D. Berkvens, A. Clinquart, G. Daube, P. Delahaut, B. De Meulenaer, S. De Saeger, L. De Zutter, J. Dewulf, P. Gustin, L. Herman, P. Hoet, H. Imberechts, A. Legrève, C. Matthys, C. Saegerman, M.-L. Scippo, M. Sindic, N. Speybroeck, W. Steurbaut, E. Thiry, M. Uyttendaele, T. van den Berg

Conflits d'intérêts

Aucun conflit d'intérêts n'a été constaté.

Remerciements

Le Comité scientifique remercie la Direction d'encadrement pour l'évaluation des risques, les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis et F. Devlieghere et G. Daube pour le 'peer review' de l'avis.

Composition du groupe de travail

Le groupe de travail était composé de:

Membres du Comité scientifique	M. Uyttendaele (rapporteur), L. Herman, L. De Zutter, M. Sindic
Experts externes	M. Polet (WIV-ISP, NRL), G. Vlaemynck (ILVO), A. Geeraerd (KUL), V. Delcenserie (ULg), B. Pochet (AFSCA)
Gestionnaire du dossier	C. Verraes

Les activités du groupe de travail ont été suivies par les membres suivants de l'administration: V. Cantaert (AFSCA).

Cadre juridique de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire ;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 09 juin 2011.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de cette version.