



## Méthodes de détermination des durées de vie microbiologique

Annie Beaufort, Afssa

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

La durée de vie microbiologique d'un aliment est la période

- par rapport à la date d'origine
- pendant laquelle l'aliment respecte les critères microbiologiques.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

La durée de vie microbiologique d'un aliment est  
déterminée lors

- De l'élaboration d'un produit nouveau ou modifié
- Du développement d'un process nouveau ou modifié
- Du développement d'un conditionnement nouveau ou modifié
- D'un changement d'ingrédients
- D'un changement d'équipement

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

**Dans le cadre du règlement (CE) N 2073/2005,  
les exploitants du secteur alimentaire**

- Veillent à ce que les denrées alimentaires **respectent les critères microbiologiques**,
- Et **conduisent des études** afin de déterminer si les critères sont respectés pendant toute la durée de conservation.
- Ce notamment pour les **Ready-to-Eat** permettant le développement de *Listeria monocytogenes*.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**La DG SANCO et le LCR *Listeria monocytogenes* ont rédigé chacun un guide en vue de la réalisation d'études relatives à la croissance de *L.m* dans les R-T-E**

- Un guide destiné aux exploitants : "Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) N 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs"
- Un guide destiné aux laboratoires : "Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods".

**Les outils présentés dans ces guides sont :**

- Les challenge tests destinés à déterminer le potentiel de croissance
- Les challenge tests destinés à déterminer le taux de croissance maximal
- La microbiologie prévisionnelle
- Les tests de vieillissement.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**En pratique, pour un nouveau produit**

- Si  $pH < 4.4$  ou  $a_w < 0.92$   
Si  $pH < 5$  et  $a_w < 0.94$  → *L. monocytogenes* ne se développe pas.

Pour des conditions de pH et d' $a_w$  différentes

- ✓ **L'aptitude de *L. m* à se développer** dans l'aliment
- ✓ Et **l'amplitude de la croissance** de *L.m* pendant une période donnée peuvent être évaluées
  - par challenge test déterminant le potentiel de croissance ( $\delta$ )
  - ou par utilisation de la microbiologie prévisionnelle

- ✓ **La concentration en *L. m* au jour le jour** peut être évaluée

- par challenge test déterminant le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ )
- ou par utilisation de la microbiologie prévisionnelle

**Pour un produit déjà commercialisé**

- ✓ Des tests de vieillissement renseignent sur la croissance de la bactérie

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Test de croissance permettant l'évaluation du potentiel de croissance

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Le challenge test permettant l'évaluation du $\delta$

- ❖ Permet de déterminer la croissance de *L.m* dans une denrée
  - **artificiellement** contaminée et
  - conservée dans des conditions raisonnablement prévisibles.
- ❖ Le potentiel de croissance est calculé selon la formule :
$$\delta = (\log_{10} \text{ufc/g à } J_{\text{final}}) - (\log_{10} \text{ufc/g à } J_0)$$
- ❖ Il peut être utilisé :
  - Pour savoir si la denrée permet le développement de *L.m*
  - Pour évaluer la concentration en *L.m* en fin de durée de vie, connaissant la concentration "sortie usine"
  - Pour évaluer la concentration en *L.m* à la production en vue de respecter la limite de 100 ufc/g.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Points à prendre en considération lors de la réalisation d'un test de croissance destiné à déterminer $\delta$

- Caractéristiques du produit
- Nombre de lots
- Choix des souches
- Préparation de l'inoculum
- Nombre minimum d'échantillons nécessaires
- Inoculation des échantillons
- Conditions de conservation de échantillons
- Analyses physico-chimiques
- Analyses microbiologiques : détection et dénombrement
- Calcul du potentiel de croissance

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Caractéristiques du produit



Informations nécessaires avant de réaliser le test de croissance

- Caractéristiques physico-chimiques
- Flore annexe
- Conditions de conditionnement

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Nombre de lots

Au moins 3 lots différents sont testés

### Choix des souches

Le test est réalisé avec un mélange de 3 souches.

Une souche de référence

Les autres souches sont issues de la même matrice ou d'une matrice similaire

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Nombre minimum d'échantillons nécessaires par lot

	$J_0$	$J_{\text{final}}$
Suivi de la concentration en <i>L. m</i>	3	3
Détection et/ou dénombrement de <i>L. m</i> dans les échantillons non contaminés : témoins d'absence de contamination (en option)	3	3
Détermination des caractéristiques physico-chimiques	3*	3*
Détermination de la flore associée	3	3

\* 1 unité si le produit est homogène

➤ Il est fortement recommandé de réaliser des dénombrements entre  $J_0$  et  $J_{\text{final}}$ .

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

## Inoculation des échantillons

- ❖ La partie d'aliment utilisée pour le challenge test est :
  - soit une partie d'une unité de vente (ou une unité de vente entière)
  - soit la partie la plus susceptible d'être contaminée (ex : la garniture d'un sandwich).



- ❖ La contamination initiale visée est de 50 ufc/g.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

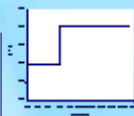
---

---

## Conditions de conservation

Reflètent les conditions raisonnables de stockage au long de la chaîne du froid

Maillon de la chaîne du froid	Température de stockage		Durée de stockage	
	Température justifiée	du	Durée justifiée	Durée de vie
De l'entreprise au meuble de vente	8°C		1/3 de la durée de vie	7 jours
Meuble de vente	12°C		1/3 de la durée de vie	1/2 (durée de vie - 7 jours)
Réfrigérateur domestique	12°C		1/3 de la durée de vie	1/2 (durée c de vie - 7 jours)



\* Température justifiée = 75ème percentile des observations

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Calcul du potentiel de croissance, $\delta$

- ❖  $\delta$  est calculé pour **chaque lot** :
  - c'est la différence entre la **médiane de la concentration en  $L_m$  à  $J_{final}$**  et la **médiane de la concentration  $L_m$  à  $J_0$** ,
  - une condition : l'écart type à  $J_0$  doit être  $\leq 0,3 \log_{10}$  ufc/g.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



## Exemple d'utilisation d'un logiciel de microbiologie prévisionnelle en vue de prévoir la probabilité de croissance

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

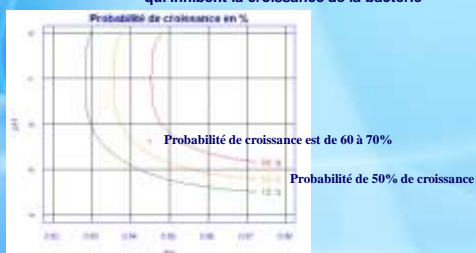
---

---

---

### Module SYM'PREVIUS relatif aux interfaces de croissance

- Prévoit les combinaisons de facteurs (pH et  $a_w$ ) qui inhibent la croissance de la bactérie



Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

## Challenge test permettant l'évaluation du taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ )

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

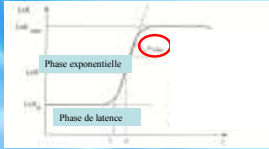
---

---

---

### Challenge test destiné à l'évaluation du $\mu_{max}$

❖ Ce test permet de mesurer le taux de croissance maximal de *L.m* dans une denrée **artificiellement contaminée** et conservée à une **température fixe**.



❖ Le  $\mu_{max}$  est la pente de la droite représentant l'évolution (en logarithme népérien) de la population pendant la phase exponentielle de croissance

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Points à prendre en considération lors de la réalisation d'un test de croissance destiné à déterminer le $\mu_{max}$

- Caractéristiques du produit
- Nombre de lots
- Choix des souches
- Préparation de l'inoculum
- **Nombre minimum d'échantillons nécessaires**
- Inoculation des échantillons
- Conditions de conservation des échantillons
- Analyses physico-chimiques
- Analyses microbiologiques : détection et dénombrement
- Calcul du taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ )

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Nombre minimum d'échantillons nécessaires par lot

	Echantillons
Suivi de la concentration en <i>L.m</i>	10 à 15
Détection et/ou le dénombrement de <i>L.m</i> dans les échantillons non contaminés )	3+ 3
Détermination des caractéristiques physico-chimiques	3* + 3*
Détermination de la flore associée	2 à 10 à 15

\* 1 unité si le produit est homogène

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Calcul du taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ )

- ❖ Les résultats des dénombrements sont saisis en  $\log_{10}$  ufc/g.
- ❖ Le logiciel extrait le  $\mu_{max}$  en ln par jour, pendant la phase exponentielle.



logiciel MicroFit

$\mu_{max} = 0,93$

- ❖ Il est possible d'exprimer le  $\mu_{max}$  à une température différente de la température de l'expérimentation.

$$\mu_{max} = \mu_{maxref} \cdot \frac{T - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}}$$

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Exemples d'utilisation du $\mu_{max}$

Exemple 1 : quelle est la croissance de *L. monocytogenes* dans un aliment ?

- ❖ Si la durée de vie est de 12 jours, 4 jours à 4 C et 8 jours à 8 C
- ❖ Croissance journalière à 8 C  $\Rightarrow 0,14 \log_{10}$  ufc/g par jour
- ❖ Croissance journalière à 4 C (déduite)  $\Rightarrow 0,05 \log_{10}$  ufc/g par jour

Croissance =

4 fois la croissance journalière à 4 C + 8 fois la croissance journalière à 8 C

$$\text{Croissance} = [(4 \times 0,05)] + [(8 \times 0,14)] = 1,32 \log_{10} \text{ ufc/g}$$

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Exemples d'utilisation du $\mu_{max}$

Exemple 2: quelle est la concentration à la fin de la durée de vie si au 7ème jour, la concentration est égale à  $1,65 \log_{10}$  ufc/g?

Rappels :

- ❖ Croissance journalière à 8 C  $\Rightarrow 0,14 \log_{10}$  ufc/g par jour

Il reste 5 jours de durée de vie à 8 C

Concentr. finale = concentr. à  $J_7$  + 5 fois la croissance journalière à 8 C

$$= 1,65 + [5 \times 0,14] = 2,35 \log_{10} \text{ ufc/g}$$

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Avantage vs inconvénients

➤ **Avantage** : déterminer la concentration en *L.m* à toute étape de la conservation

➤ **Inconvénients** :

- plus coûteux, plus consommateur de temps que le challenge test destiné à la détermination du  $\delta$ ; la phase de latence et la phase stationnaire ne sont pas prises en compte.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

Exemple d'utilisation d'un logiciel de microbiologie prévisionnelle pour déterminer la concentration en *L.m* au jour le jour

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

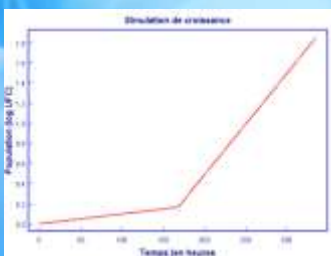
---

---

### Module SYM'PREVIUS relatif à la simulation de croissance

#### Approche déterministe

- Durée de vie : 14 jours
- Caractéristiques physico-chimiques : pH = 5,6;  $a_w = 0,96$
- Profil thermique : 1/2 à 4 C, 1/2 à 8 C



Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

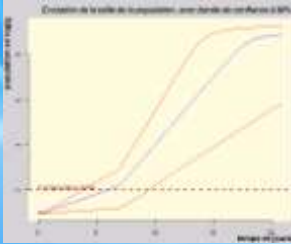
---

---

## Module SYM'PREVIUS relatif à la simulation de croissance

### Approche probabiliste

- Durée de vie : 21 jours
- Caractéristiques physico-chimiques : pH = 6;  $a_w = 0,98$
- Profil thermique : 1/3 à 4 C, 2/3 à 8 C



- Cette approche tient compte de la variabilité relative au produit.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Tests de vieillissement

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Test de vieillissement

Test destiné à évaluer la croissance d'un micro-organisme, dans une denrée :

- naturellement contaminée,
- et dans des conditions raisonnablement prévisibles de stockage au long de la chaîne du froid.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Points à prendre en considération

- Echantillonnage
- Conditions de conservation des échantillons
- Analyses microbiologiques
- Calcul du pourcentage d'échantillons dépassant la limite de 100 *L. monocytogenes*/g en fin de durée de vie

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Echantillonnage

L'objectif est de sélectionner une sous-population "n" représentative de la population "N".

La sélection aléatoire peut être réalisée avec un logiciel :

- Soit au niveau du stockage des produits finis, la base de sondage étant constituée par tous les produits identifiés.
- Soit à la sortie de la chaîne de fabrication, la base de sondage étant constituée par le moment de la sortie de chaîne.

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

### Interprétation des résultats

➤ L'interprétation des tests de vieillissement est réalisée à partir des résultats obtenus en fin de durée de vie.

➤ Le résultat attendu est "le pourcentage d'échantillons dépassant en fin de durée de vie la limite de 100 ufc/g".

Echanges sur la mise en place des plans de maîtrise sanitaire, le 9 décembre 2008

---

---

---

---

---

---

---

---

**Calcul du pourcentage d'échantillons positifs en *L. monocytogenes***

<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	CI à 95 %
20	0	0 %	[0 % - 16 %]
100		0 %	[0 % - 4 %]
20	1	5 %	[1 % - 24 %]
100		1 %	[0.2 % - 5 %]
20	2	10 %	[3 % - 30 %]
100		2 %	[0.6 % - 7 %]

➤ Il est nécessaire de raisonner sur un nombre important de résultats en vue d'aboutir à un intervalle de confiance réduit.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



**Merci pour votre attention !**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---