

Travaux dirigés n°2 : Exploitation des résultats d'un test de croissance

Remarque : les données chiffrées sont fictives et ne sont pas en lien avec les Travaux dirigés n° 1.

I. Exploitation des résultats d'un test de croissance visant à obtenir un potentiel de croissance pour *Listeria monocytogenes*

Source des données **TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods Annie BEAUFORT et coll. Afssa Lerpaq, LCR *Listeria monocytogenes*, Maisons-Alfort, France**

Dans le cadre du règlement européen (EC) No. 2073/2005, le potentiel de croissance peut être utilisé pour classer les aliments:

☞ si $\delta > 0.5 \log_{10} \text{ ufc/g}$, denrées prêtes à être consommés permettant la croissance de *L. monocytogenes* (catégorie 1.2),

☞ when $\delta \leq 0.5 \log_{10} \text{ cfu/g}$, denrées prêtes à être consommés ne permettant pas la croissance de *L. monocytogenes* (catégorie 1.3),

Exemple 1

Taux initial en *L. monocytogenes* ciblé de 50 ufc/
Conservation 9 jours selon scénario 1/3 à 4°C et 2/3 à 8°C

Table 3. First example of results obtained from a growth potential test.

The limit of enumeration is 5 cfu/g.

Batches	Day	Concentration (cfu/g)	Concentration (log ₁₀ cfu/g) In bold: median	Difference between the median concentration at "day end" and the median concentration at "day 0" (log ₁₀ cfu/g)	Growth potential (δ) = maximum of the differences
1	"day 0"	30	1.48	1.46-1.48=-0.02	0.42
		50	1.70		
		20	1.30		
	"day end"	43	1.63		
		24	1.38		
		29	1.46		
2	"day 0"	45	1.65	1.46-1.48=-0.02	0.42
		30	1.48		
		30	1.48		
	"day end"	29	1.46		
		43	1.63		
		14	1.15		
3	"day 0"	<5	<0.70	1.72-1.30=0.42	0.42
		25	1.40		
		20	1.30		
	"day end"	52	1.72		
		38	1.58		
		81	1.91		

Pour être valide, l'écart-type des dénombrements à J0 doit être < 0,3 ulog

Dans cet exemple, l'écart type entre les 3 résultats à J0 est de :

0.20 log₁₀ ufc /g pour batch 1; 0.10 log₁₀ ufc/g pour batch 2, and 0.07 log₁₀ ufc/g pour batch 3, (résultats < seuil de dénombrement non pris en compte)

La différence maximale entre la concentration médiane à J0 et à Jfinal est de : $\delta = 0.42$ (log₁₀ ufc/g).

Question 1 : Cet aliment permet-il la croissance de *Listeria monocytogenes* ?

-non dans les conditions de réalisation du test (température notamment)

Exemple 2

Taux initial en *L. monocytogenes* ciblé de 50 ufc/
Conservation 9 jours selon scénario 1/3 à 4°C et 2/3 à 8°C

Compléter le tableau suivant

Table 4. Second example of results obtained from a growth potential test.

The limit of enumeration is 5 cfu/g.

Batches	Day	Concentration (cfu/g)	Concentration (log ₁₀ cfu/g) In bold: median	Difference between the median concentration at "day end" and the median concentration at "day 0" (log ₁₀ cfu/g)	Growth potential (δ) = maximum of the differences
1	"day 0"	25 20 55	40	-----	
	"day end"	100 210 190	150		
2	"day 0"	60 30 50	40	-----	
	"day end"	250 350 390	350		
3	"day 0"	20 25 20	20	-----	
	"day end"	43 52 76	43		

Pour être valide, l'écart-type des dénombrements à J0 doit être < 0,3 ulog

Tableau de résultats ci dessous

Table 4. Second example of results obtained from a growth potential test.

The limit of enumeration is 5 cfu/g.

Batches	Day	Concentration (cfu/g)	Concentration (log ₁₀ cfu/g) In bold: median	Difference between the median concentration at "day end" and the median concentration at "day 0" (log ₁₀ cfu/g)	Growth potential (δ) = maximum of the differences
1	"day 0"	25 20 55	1.40 1.30 1.74	2.28-1.40 = 0.88	0.88
	"day end"	100 210 190	2.00 2.33 2.28		
2	"day 0"	60 30 50	1.78 1.48 1.70	2.54-1.70 = 0.84	
	"day end"	250 350 390	2.40 2.54 2.59		
3	"day 0"	20 25 20	1.30 1.40 1.30	1.72-1.30 = 0.42	
	"day end"	43 52 76	1.63 1.72 1.88		

Question 2 : Calculer l'écart type des dénombrements à J0 : le test est-il valide ? oui

Dans cet exemple, l'écart type entre les 3 résultats à J0 est de :

0.23 log₁₀ ufc/g pour batch 1; 0.16 log₁₀ ufc /g pour batch 2, and 0.06 log₁₀ ufc /g pour batch 3.

Question 3 : Calculer le potentiel de croissance :

La différence maximale entre la concentration médiane à J0 et à Jfinal est de : δ = 0.88 (log₁₀ cfu/g).

Question 4 : Cet aliment permet-il la croissance de Listeria monocytogenes ?

-oui dans les conditions de réalisation du test (température notamment) : δ > 0,5 ulog

Question 5 : Si la concentration initiale en L. monocytogenes dans le produit en sortie de fabrication est de 10 ufc/g soit 1 log₁₀ ufc/g :

- quelle sera la concentration atteinte prévue en fin de durée de vie ? à exprimer en ufc/g

final concentration finale = initial initiale + δ
soit 1 + 0.88 = 1.88 log₁₀ cfu/g (= 76 cfu/g)

- Le seuil de 100 ufc/g à durée de vie sera-t-il respecté ? oui (= 76 cfu/g < 100 cfu/g)

Question 6 : Quelle doit être le taux de contamination initial en sortie de fabrication pour respecter la limite de 100 ufc/g à durée de vie ? à exprimer en ufc/g

- concentration initiale = concentration finale - δ
soit 2 - 0.88 = 1.12 log₁₀ cfu/g (= 13 cfu/g)

Question 7 : Dans quelles conditions puis-je exploiter ces données ?

Pour une température de stockage ou un scénario thermique identique à celui du test de croissance, pour le même produit (aw pH conservateurs, composition)

Question 8 : Quelles sont les limites de l'interprétation de ces données ?

- variabilité des souches : souches contaminant naturellement le produit est sans doute un peu différente de celle utilisée lors du test de croissance : croissance plus ou moins rapide. L'état physiologique des souches contaminant naturellement le produit est sans doute différent : phase de latence plus ou moins longue
- incertitude de mesures

II. Exploitation des résultats d'un test de croissance visant à obtenir un **taux de croissance** pour *Listeria monocytogenes*

II.1. PARTIE I : utilisation de modèles secondaire

Source des données **TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods Annie BEAUFORT et coll. Afssa Lerpaq, LCR *Listeria monocytogenes*, Maisons-Alfort, France**

Données nécessaires : Tableau de dénombrement en ufc/g en \log_{10} ufc/g et T°C du test

Ajustement de la courbe : exemple Microfit software (www.ifr.ac.uk/MicroFit/)

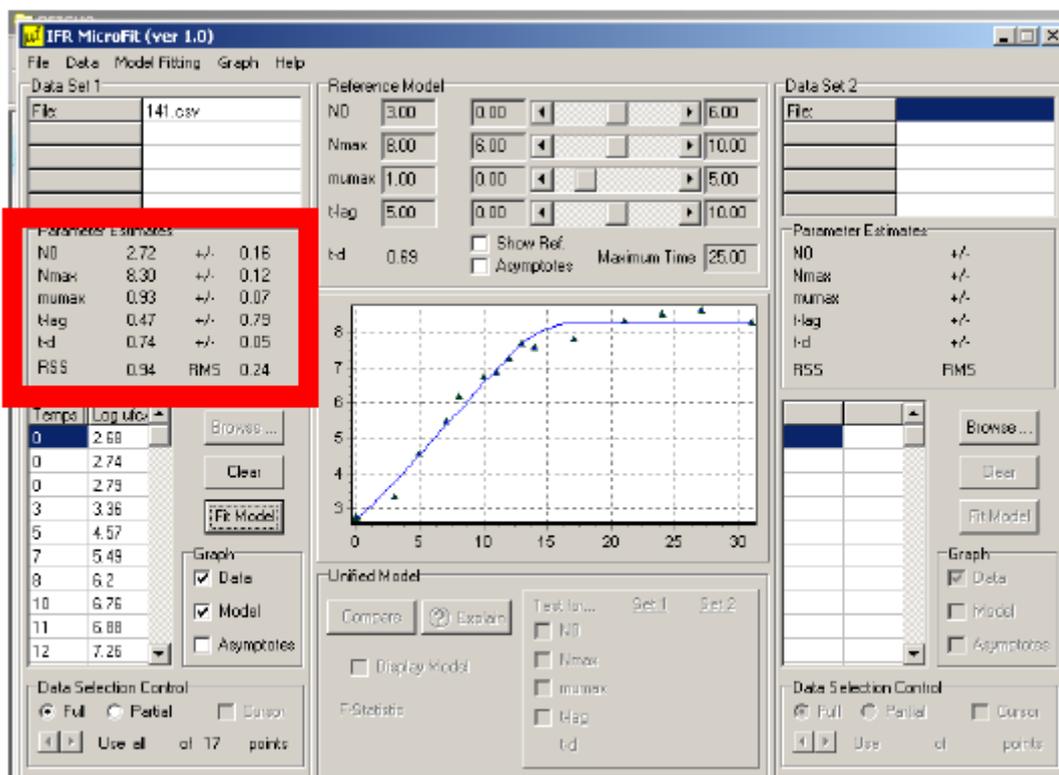


Figure 2. Use of Microfit software to fit a growth curve

Paramètres fournies par le logiciel :

- * taux de croissance μ_{max} en jour^{-1} ,
- * temps de latence en jour,
- * temps de génération $= \ln 2 / \mu_{max}$, en jour
- * taux de contamination initial en \log ufc/g,
- * taux de contamination maximal N_{max} en \log ufc/g

Exploitation des résultats

Connaissant le μ_{max} dit de référence à une température T_{ref} , il est possible de calculer la valeur de μ_{max} à une autre température T .

Si T et T_{ref} sont tous deux $< 25^\circ\text{C}$, la formule simplifiée suivante peut être utilisée:

$$\mu_{\max} = \mu_{\max_{\text{ref}}} \cdot \frac{(T - T_{\min})^2}{(T_{\text{ref}} - T_{\min})^2}$$

(with T_{\min} = minimal growth temperature for *L. monocytogenes* $\approx -2^{\circ}\text{C}$)

$\mu_{\max_{\text{ref}}}$ et μ_{\max} peuvent être exprimés en \log_{10} ufc/g par jour en divisant leur valeur par 2.3 [=ln(10)]

Application:

- **Données:**

- Durée de vie: 9 jours,

- Conditions de conservation : 4°C pendant 3 jours (d_1) and 8°C pendant 6 jours (d_2)

Le test de croissance a été réalisé à $T_{\text{ref}} = 8^{\circ}\text{C}$ et a permis de déterminer $\mu_{\max_{\text{ref}}} = 0.78 \ln \text{ cfu/g}$ par jour transformé en $0.34 \log_{10} \text{ cfu/g}$ par jour.

Question 1 : Quel est le taux de croissance prédit à 4°C :

$$\mu_{\max} = \mu_{\max_{\text{ref}}} \cdot \frac{(T - T_{\min})^2}{(T_{\text{ref}} - T_{\min})^2}$$

$$\mu_{\max} = \left[0.78 \frac{(4 - (-2))^2}{(8 - (-2))^2} \right]$$

Le taux de croissance prédit à 4°C est de $0.12 \log_{10} \text{ ufc/g}$ par jour

- **Question 2: Quelle est la croissance de *L. monocytogenes* prédite durant la durée de vie dans des conditions de conservation 1/3 à 4°C et 2/3 à 8°C ?**

Croissance Durant la durée de vie =

$[(\mu_{\max 1} \text{ en } \log_{10} \text{ cfu/g par jour}) \times d_1] + [(\mu_{\max 2} \text{ en } \log_{10} \text{ cfu/g par jour}) \times d_2]$ où:

$$= (3 \times 0.12) + (6 \times 0.34) = 2.40 \log_{10} \text{ cfu/g}$$

Remarque : aucune phase de latence prise en compte, prévision sécuritaire

- **Question 3: quelle devrait être la concentration en *L. monocytogenes* en début de durée de vie pour respecter le seuil de 100 cfu/g ?**

∩ Initial concentration initiale = concentration finale – croissance durant la durée de vie

La concentration finale correspond à la limite de 100 ufc/g ($2 \log_{10} \text{ ufc/g}$)

$$2 - 2.40 = -0.40 \log_{10} \text{ cfu/g} = 0.4 \text{ cfu/g}$$

- **Question 4 : Quelle sera la concentration en *L. monocytogenes* à durée de vie si une concentration de $1.65 \log_{10} \text{ ufc/g}$ est dénombré après 7 jours de conservation**

Le niveau atteint par *L. monocytogenes* à la fin de la durée de vie sera : $1.65 + (0.34 \times 2 \text{ jours}) = 3.33 \log_{10} \text{ cfu/g}$.

- **Le produit respectera-t-il le critère microbiologique de 100 ufc/g ? et quelle sera la conduite à tenir ?** non teneur > 1000 ufc/g ; rappel produit

II.1. PARTIE II : utilisation de l'outil Sym'Previus

Source des données RMT « Expertise pour la détermination de la durée de vie microbologique des aliments » et logiciel Sym'Previus

1. Résultats d'un test de croissance avec *Listeria monocytogenes*

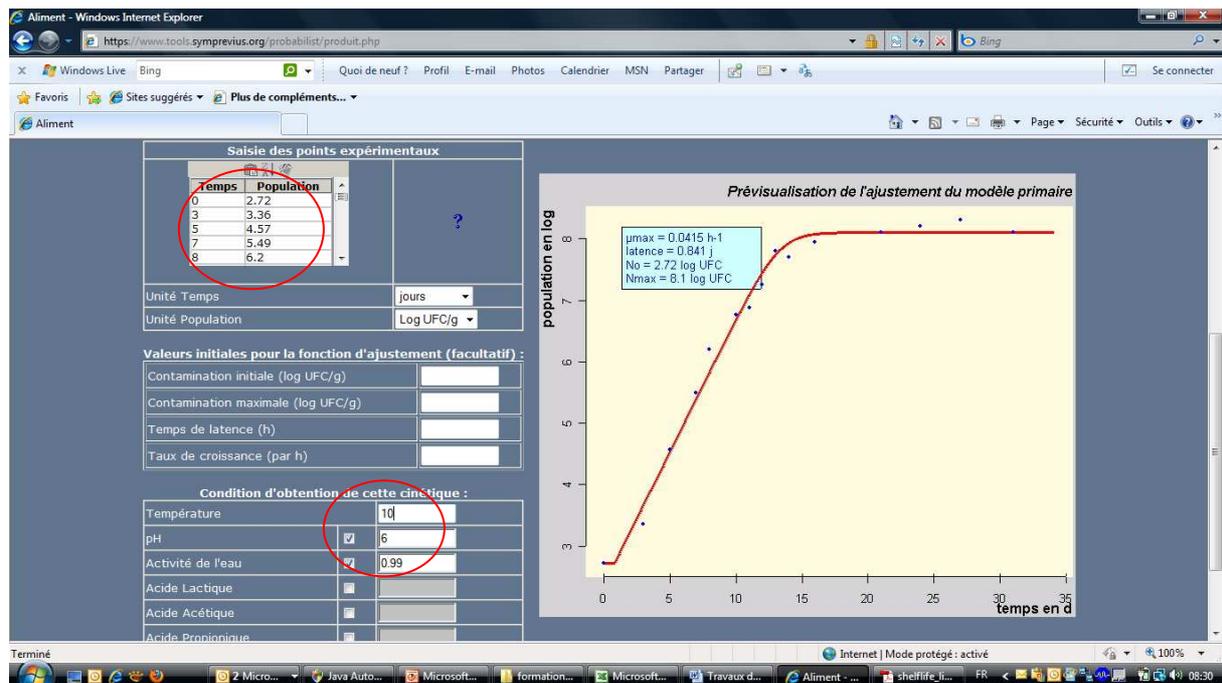
Caractéristiques physico-chimiques de l'aliment pH = 6 et aw = 0,99 du produit
T° du test = 10°C

Tableau de dénombrement en ufc/g en log₁₀ ufc/g.

temps en jours	numération en log
0	2,72
3	3,36
5	4,57
7	5,49
8	6,2
10	6,76
11	6,88
12	7,26
13	7,8
14	7,7
16	7,95
21	8,1
24	8,2
27	8,3
31	8,1

2. Ajustement de la courbe : logiciel Sym Previus – module probabiliste

données nécessaires : T° du test = 10°C, pH = 6 et aw = 0,99 du produit



Paramètres fournis par le logiciel :

- * taux de croissance μ_{max} en h⁻¹,
- * temps de latence en jour,
- * taux de contamination initial en log ufc/g et
- * taux de contamination maximal Nmax en log ufc/g

Les données calculées à partir de la courbe de calage à 10°C permettent de définir les paramètres de croissance optimal dans l'aliment en tenant compte des valeurs cardinales de croissance de *L monocytogenes* (T_{min} T_{opt} T_{max}) (pH_{min} pH_{opt} pH_{max}) (aw_{min} aw_{opt} aw_{max})

Valeurs des paramètres optimaux		
	Moyenne	Ecart-Type
Taux de croissance optimum(/h)	0.501	0.0684
Temps de génération optimum (h)	1.38	0.187
Temps de latence optimum (h)	1.66	0.371
Population maximale (log)	8.1	0.0726

Ces paramètres de croissance permettent de simuler la croissance dans d'autres conditions de T°C pH et aw.

2. simulation n°1 : logiciel Sym Previus – module p robabiliste

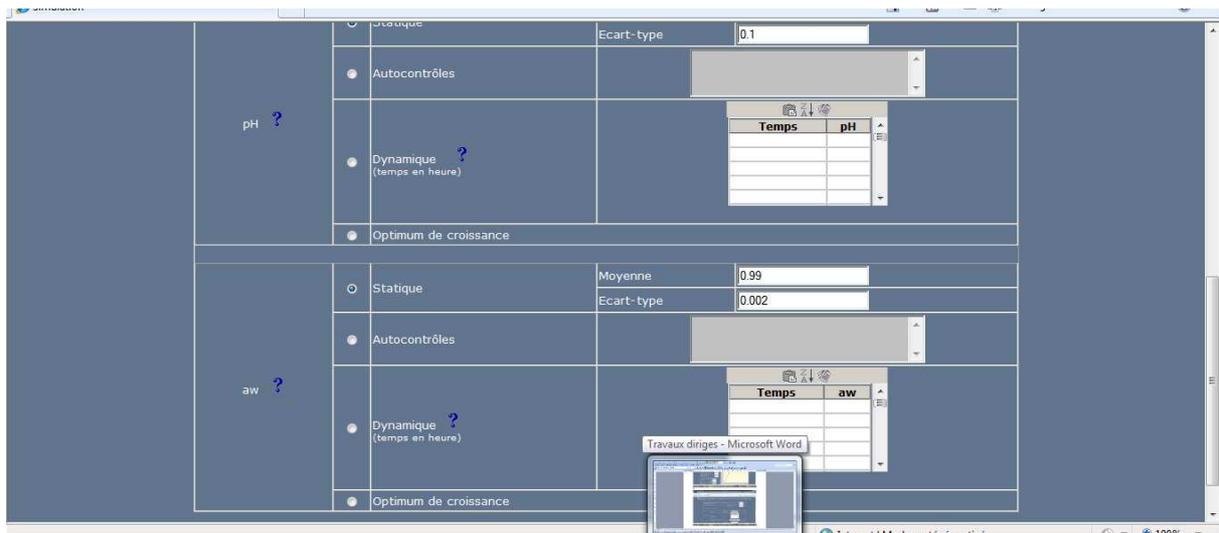
Taux de contamination initial de 10 ufc/g

Taux de contamination à ne pas dépasser 100 ufc/g (2 log ufc/g)

Durée de conservation : 9 jours

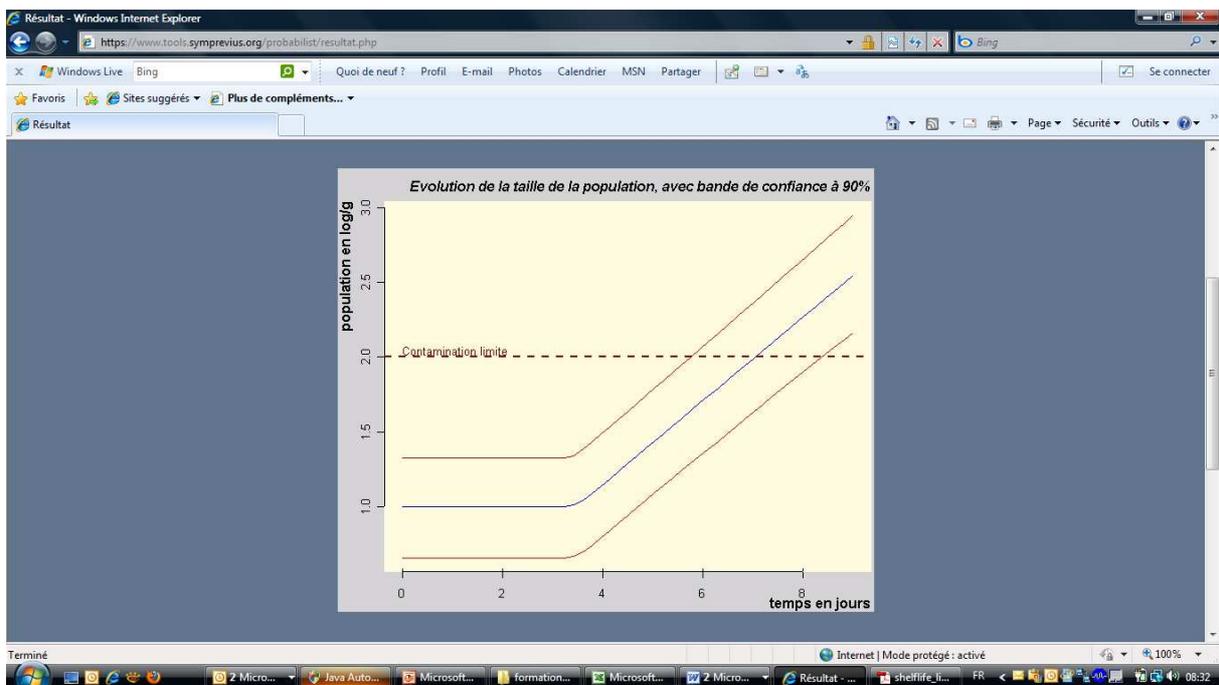
Poids des unités de vente 250g ± 10 g

Température de conservation : 1/3 à 4°C et 2/3 à 8° C



Résultats de la simulation n°1

a) évolution de la taille de contamination (figure 1)



Légende : en bleu : courbe médiane : en rouge : bandes de confiance

b) Evolution de la densité de contamination

Pourcentage d'unités de vente contaminés à J0 et qui dépasseront le seuil de 100 ufc/g :

Fig 2 après ~ 5 jours

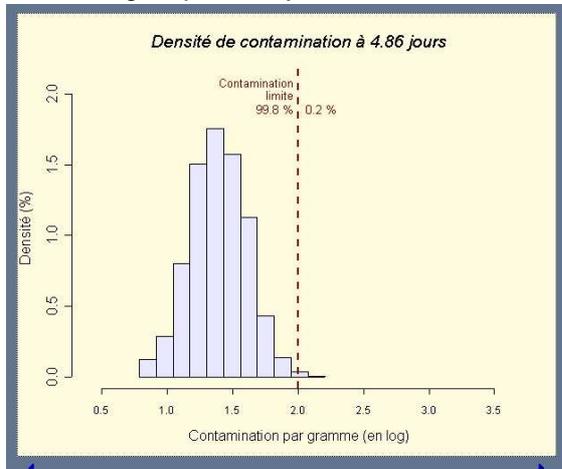


Fig 3 après ~ 6 Jours

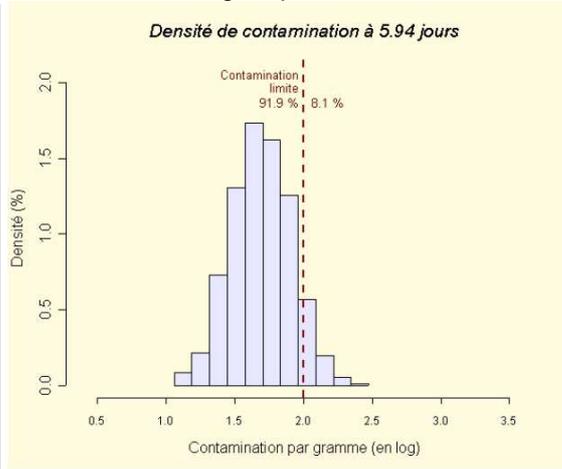


Fig 4 après ~ 7 jours

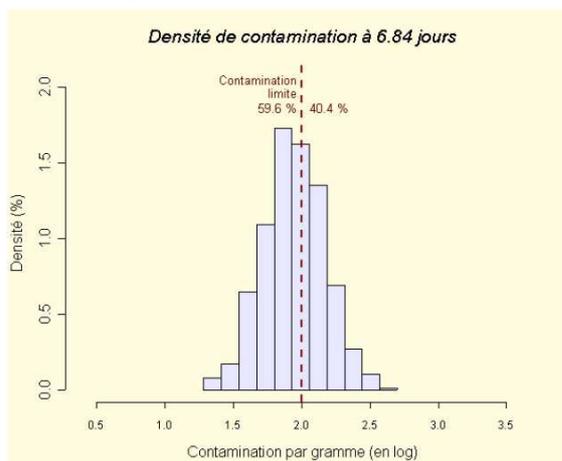
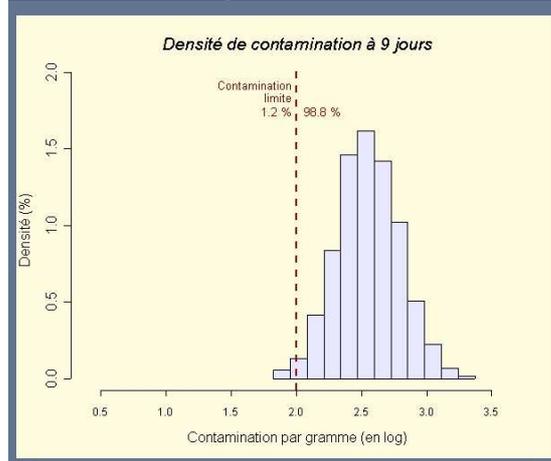


Fig 5 à durée de vie



3. simulation n°2 : logiciel Sym'Previus

Taux de contamination initial correspondant à une présence dans 25 g soit au moins une cellule dans 25 g (0.04 ufc/g soit - 1,4 log ufc/g)

Taux de contamination à ne pas dépasser 100 ufc/g (2 log ufc/g)

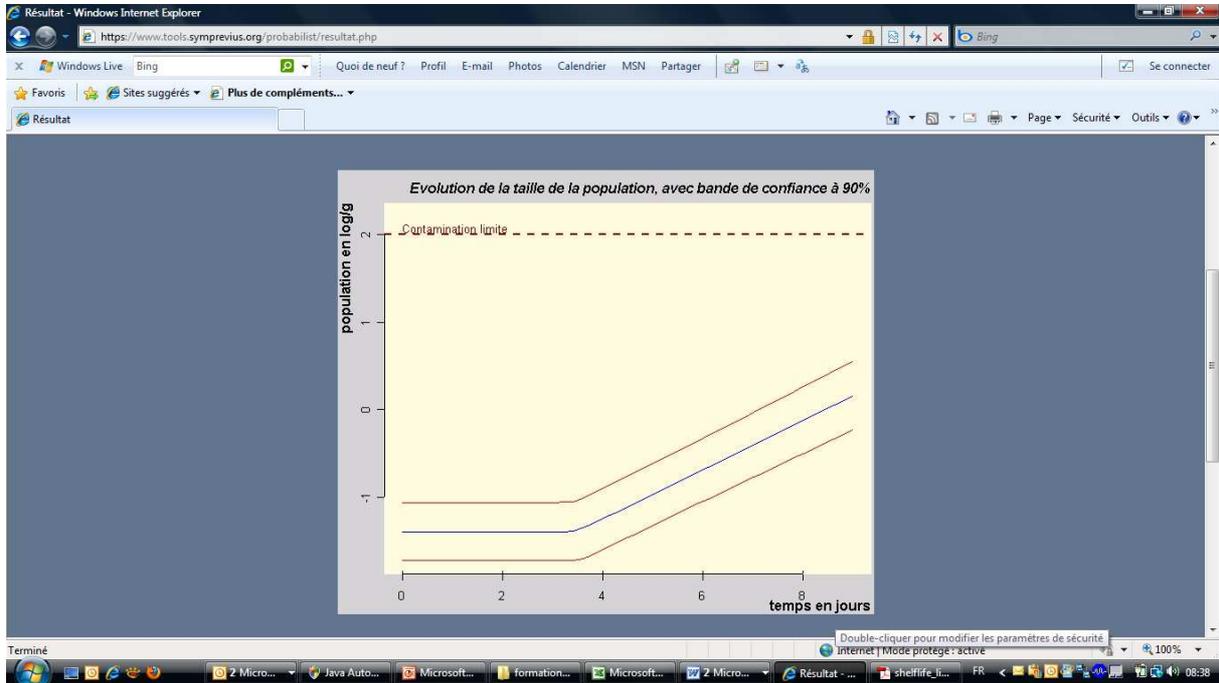
Durée de conservation : 9 jours

Poids des unités de vente 250g ± 10 g

Température de conservation : 1/3 à 4°C et 2/3 à 8° C

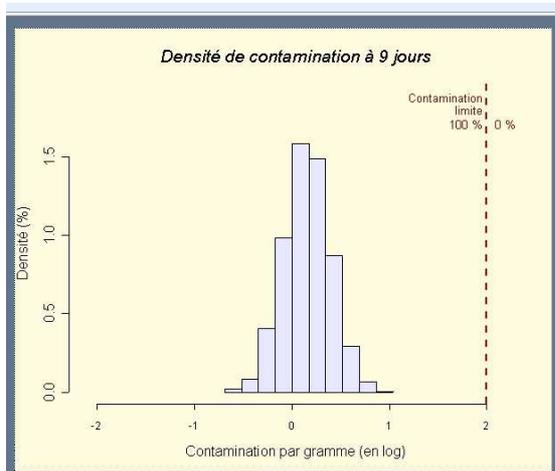
Résultats de la simulation n°2

a) évolution de la taille de contamination (figure 6)



Légende : en bleu : courbe médiane : en rouge : bandes de confiance

b) Evolution de la densité de contamination (figure 7)



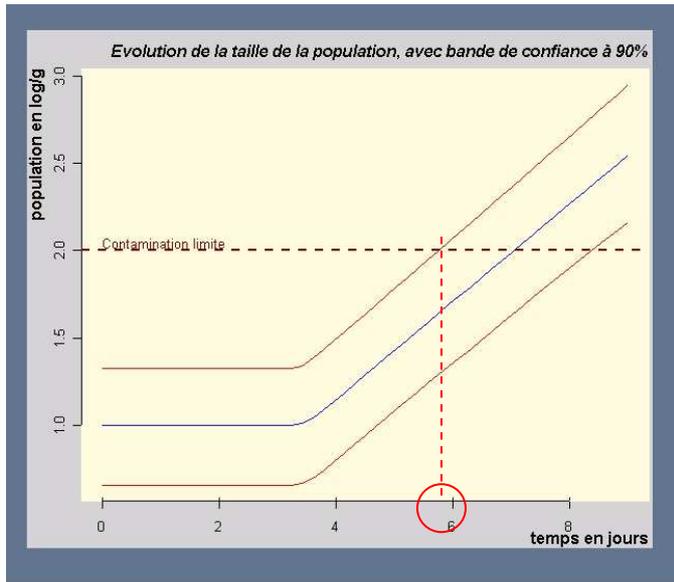
Question 1 : à partir d'un taux de contamination initial de 10 ufc/g, le seuil de 100 ufc/g à durée de vie (9 jours) risque t-il d'être dépassé ?

Oui les seuils atteints à durée de vie sont compris entre 2,1 et 3 ulog

Question 2 : Si oui quelle durée de vie préconiserez-vous ?

La durée de vie doit être inférieure à 6 jours pour limiter les risques de dépassement du seuil de 100 ufc/g en cas de contamination initiale de 10 ufc/g selon un scénario 1/3 à 4°C et 2/3 à 8°C .

L'évolution des contaminations indiquent qu'une durée de vie de 5 jours serait plus sécuritaire (figure 2).



Question 3 : si les analyses microbiologiques effectuées sur le produit en sortie de fabrication montrent parfois une présence de *L. monocytogenes* dans 25 g mais avec des dénombrements toujours inférieurs à 5 ufc/g, le seuil de 100 ufc/g à durée de vie (9 jours) risque-t-il d'être dépassé ?

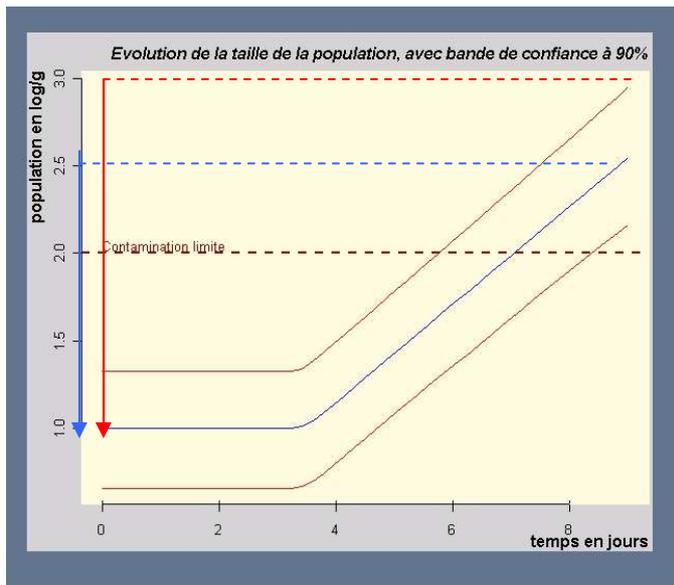
Pour des taux de contamination très faibles (1 cellule dans 25 g), le seuil de 100 ufc/g n'est pas dépassé à durée de vie selon un scénario 1/3 à 4°C et 2/3 à 8°C (figures 6 et 7)

Question 4 : la durée de vie de 9 jours vous paraît-elle acceptable en cas de prévalence faible et à faible taux de *L. monocytogenes* ?

Oui en cas de respect de la chaîne du froid

Question 5 : quel est le potentiel de croissance de *L. monocytogenes* dans le produit après 9 jours de conservation selon un scénario 1/3 à 4°C et 2/3 à 8°C ?

Le potentiel de croissance médian est : concentration finale (2,5 ulog) – concentration initiale (1 ulog) = 1,5 ulog et peut atteindre 2 ulog.

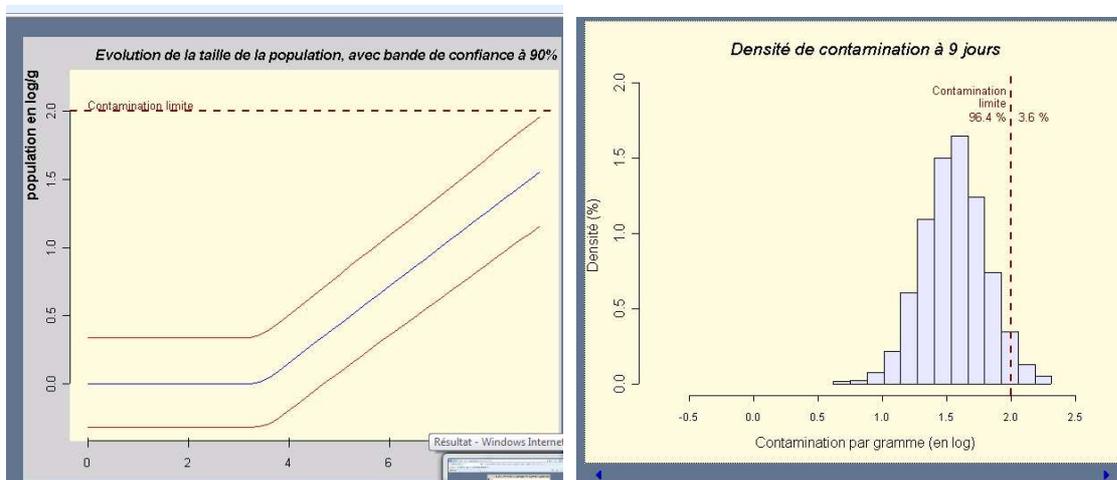


Question 6 : quelle devrait être la concentration en *L. monocytogenes* en début de durée de vie pour respecter le seuil 100 cfu/g?

Seuil à respecter (2 ulog) – potentiel de croissance (1,5 ulog) = 0,5 ulog (3 ufc/g)

Pour être sécuritaire Seuil à respecter (2 ulog) – potentiel de croissance (2 ulog) = 0 ulog (1 ufc/g)

Illustration : simulation à partir d'un seuil de 1 ufc/g soit 0 ulog ci-dessous



Remarque : le risque « 0 » n'existe pas !