

# Intérêt de la microbiologie prévisionnelle dans l'appréciation de l'exposition alimentaire à *Listeria monocytogenes*.

## *Significance of predictive microbiology for the assessment of the exposure of food to Listeria monocytogenes*

Par Jean-Christophe AUGUSTIN<sup>(1)</sup>  
(communication présentée le 24 avril 2003)

### RÉSUMÉ

L'appréciation des risques microbiologiques permet d'évaluer les risques liés à la présence de micro-organismes pathogènes dans les aliments. Cette évaluation repose en grande partie sur une appréciation de l'exposition aux micro-organismes qui nécessite le recueil d'une quantité importante d'informations sur la nature de l'aliment, sur son circuit de distribution, sur ses modes de consommation ainsi que sur le micro-organisme et son comportement dans l'aliment. Cette étude théorique sur *Listeria monocytogenes* illustre la méthode d'appréciation de l'exposition et présente son intérêt pour l'évaluation objective de l'impact de certaines options de maîtrise.

**Mots-clés :** appréciation des risques, microbiologie prévisionnelle, *Listeria monocytogenes*.

### SUMMARY

*The connection between equine uveitis and leptospirosis can be established using various techniques: isolation of the organism ; detection of agglutinative antibodies (micro-agglutination test or MAT) provided antibody levels are very high or rising very fast ; detection of antibodies directed against leptospiral proteins other than lipopolysaccharides (Dot-Blot) ; and finally by genic amplification (Polymerase Chain Reaction). The results obtained with these various methods are discussed here.*

**Key words:** risk assessment, predictive microbiology, *Listeria monocytogenes*.

#### Note

(1) Service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale - École Nationale Vétérinaire d'Alfort - 7, avenue du Général de Gaulle - F-94704 Maisons-Alfort Cedex - France - Tel : (33) (0) 1 43 96 70 43 - Fax : (33) (0) 1 43 96 71 21 - E-mail : jcaugustin@vet-alfort.fr

## • INTRODUCTION

L'accord sur les mesures sanitaires et phytosanitaires signé dans le cadre de l'Organisation Mondiale du Commerce prévoit que ces mesures de protection soient justifiées par le pays les mettant en place, sur la base d'une appréciation des risques liés à la présence d'agents dangereux dans les aliments. Cette appréciation fait partie du processus d'analyse des risques qui comporte en outre deux autres composantes (fig. 1) : la gestion des risques qui consiste, sur la base de leur appréciation, à pondérer des choix politiques et à sélectionner les options appropriées de leur maîtrise, et la communication à leur propos, qui permet un échange d'informations et d'opinions entre les évaluateurs, les gestionnaires et les autres parties intéressées comme par exemple, les consommateurs.

La méthode d'appréciation des risques microbiologiques a fait l'objet d'une norme adoptée par la Commission du Codex Alimentarius (CCFH, 1999). La tâche de l'évaluateur consiste donc à apprécier le risque et à évaluer l'impact d'options de gestion sur celui-ci. Il doit pour cela identifier les micro-organismes qui peuvent être présents dans un aliment et qui sont susceptibles de provoquer des effets néfastes pour la santé du consommateur (fig. 1) ; il doit aussi apprécier l'exposition à ces dangers en évaluant de façon qualitative et/ou quantitative leur probabilité d'ingestion. En croisant cette appréciation de l'exposition avec l'appréciation des effets qui établit la relation entre le degré d'exposition aux dangers et les effets qui en résultent pour la santé, il est en mesure d'estimer les risques, c'est-à-dire d'estimer qualitativement et/ou quantitativement, en incluant les incertitudes, la probabilité de survenue et la gravité des effets néfastes liés à la présence d'un micro-organisme pathogène dans un aliment.

L'appréciation des risques repose donc en grande partie sur l'appréciation de l'exposition aux dangers, qui constitue une étape clé du processus d'analyse des risques, car de sa pertinence dépend la validité des résultats obtenus et surtout des options de maîtrise mises en œuvre avec les conséquences sanitaires et socio-économiques que celles-ci peuvent avoir.

L'objectif de cette étude est d'illustrer la démarche d'appréciation de l'exposition et de montrer tout l'intérêt que peut avoir la microbiologie prévisionnelle, outil qui permet de prévoir le comportement d'un micro-organisme dans un aliment. Pour cela, nous prendrons comme exemple théorique le cas d'un aliment transformé, solide, consommé en l'état et pouvant être contaminé par *Listeria monocytogenes*. Après avoir apprécié l'exposition du consommateur au pathogène dans des conditions normales de fabrication et de commercialisation, nous verrons l'impact que peuvent avoir certaines options de maîtrise. Il est important de préciser que cet article est purement didactique et qu'une appréciation de l'exposition lié à la consommation d'un aliment réel imposerait une validation des différentes hypothèses explicites et implicites faites dans l'étude.

(fig.1)

## • MODÈLE D'APPRÉCIATION DE L'EXPOSITION

La figure 2 présente le diagramme relatif au modèle d'appréciation de l'exposition considéré dans l'étude.

(fig. 2)

### Contamination initiale des portions ingérées par le consommateur

La contamination initiale de l'aliment à la production peut être estimée à partir d'enquêtes destinées à connaître la prévalence de la contamination par *L. monocytogenes* ou à partir des résultats d'autocontrôle du fabricant. La proportion  $p$  d'unités de 25 g contenant *L. monocytogenes* permet d'estimer la concentration  $c$  de ce micro-organisme par g d'aliment en supposant que sa distribution dans l'aliment est totalement aléatoire. L'application de la loi de Poisson donne la relation :  $c = -(1/25) \cdot \ln(1-p)$ . On peut ainsi estimer le nombre initial de cellules de *L. monocytogenes* présentes dans une portion alimentaire de  $m$  g, puisque ce nombre suit une distribution de Poisson d'espérance  $m \cdot c$ .

L'incertitude sur la proportion  $p$  sera prise en compte en utilisant une valeur issue d'une distribution Beta (Tableau I) de paramètres  $n \cdot p + 1$  et  $n - n \cdot p + 1$  (VOSE, 2000, p. 71) plutôt que directement la valeur  $p$  observée dont la précision dépend du nombre total  $n$  d'analyses effectuées.

De même, pour prendre en compte la variabilité du comportement des consommateurs, la masse de la portion ingérée  $m$  (g) sera issue d'une distribution BetaPERT modifiée (VOSE, 2000, p. 277).

### Comportement de *L. monocytogenes* dans l'aliment pendant son stockage chez le producteur, le distributeur et le consommateur

La contamination en *L. monocytogenes* va augmenter pendant les phases de stockage chez le producteur, le distributeur et chez le consommateur. Les modèles de microbiologie prévisionnelle permettent d'évaluer la croissance du pathogène.

Pour décrire l'évolution de la concentration microbienne avec le temps, nous avons utilisé le modèle logistique avec délai (ROSSO *et al.*, 1996) :

$$x(t) = \begin{cases} x_i & , \text{si } t \leq lag \\ \frac{x_i \cdot x_{max}}{1 + \left(\frac{x_{max}}{x_i} - 1\right) \cdot \exp(-\mu_{max} \cdot (t - lag))} & , \text{si } t > lag \end{cases}$$

où  $x(t)$  est la concentration bactérienne (germes·g<sup>-1</sup>) à l'instant  $t$ (h) de l'étape de stockage considérée,  $x_i$  la concentration au début de l'étape de stockage ( $t = 0$ ),  $x_{\max}$  la concentration bactérienne maximale (fixée ici à  $5 \times 10^9$  germes·g<sup>-1</sup>),  $lag$  le temps de latence (h) et  $\mu_{\max}$  le taux de croissance maximal (h<sup>-1</sup>) pendant l'étape de stockage.

Pour décrire l'effet des caractéristiques du produit (pH et activité de l'eau) et de la température de stockage sur le taux de croissance, nous avons utilisé le modèle cardinal avec interactions (AUGUSTIN et CARLIER, 2000) :

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot (CM_2(T) \cdot CM_1(pH) \cdot CM_2(aw))^2$$

avec

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0 & , \text{si } X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\max}) \cdot (X - X_{\min})^n}{(X_{\text{opt}} - X_{\min})^{n-1} \cdot [(X_{\text{opt}} - X_{\min}) \cdot (X - X_{\text{opt}}) - (X_{\text{opt}} - X_{\max}) \cdot ((n-1) \cdot X_{\text{opt}} + X_{\min} - n \cdot X)]} & , \text{si } X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0 & , \text{si } X \geq X_{\max} \end{cases}$$

et

$$X_{\min} = X_{\text{opt}} - (X_{\text{opt}} - X_{\min}^0) \cdot \left( 1 - \left[ \frac{Y_{\text{opt}} - Y}{Y_{\text{opt}} - Y_{\min}^0} \right]^3 - \left[ \frac{Z_{\text{opt}} - Z}{Z_{\text{opt}} - Z_{\min}^0} \right]^3 \right)^{1/3}$$

où  $X, Y, Z$  représentent la température, le pH ou l'activité de l'eau,  $\mu_{\text{opt}}$  est le taux de croissance optimal (h<sup>-1</sup>) lorsque la température  $T$  (°C) est égale à  $T_{\text{opt}}$ , le pH égal à  $pH_{\text{opt}}$  et l'activité de l'eau  $aw$  égale à  $aw_{\text{opt}}$ .  $X_{\min}$  est la valeur minimale de croissance,  $X_{\text{opt}}$  la valeur optimale de croissance,  $X_{\max}$  la valeur maximale de croissance. est  $X_{\min}^0$  la valeur minimale absolue lorsque les autres facteurs sont à leur optimum.

Pour décrire l'effet de l'histoire thermique sur le temps de latence  $lag_i$  à l'étape de stockage  $i$ , nous avons utilisé le modèle suivant (AUGUSTIN *et al.*, 2000) :

$$lag_i = \frac{1}{\mu_i} \cdot \max(\mu_{i-1} \cdot (lag_{i-1} - t_{i-1}); 0)$$

où  $\mu_i$  est le taux de croissance maximal à l'étape  $i$ ,  $\mu_{i-1}$ ,  $lag_{i-1}$  respectivement le taux de croissance maximal et le temps de latence à l'étape de stockage précédente  $i-1$ ,  $t_{i-1}$  la durée de cette étape. Le produit initial  $\mu_0 \cdot lag_0$  est égal à une constante  $K_0$  qui dépend de l'état physiologique du micro-organisme contaminant le produit.

La croissance de *L. monocytogenes* pendant les phases de stockage dépend donc de paramètres biologiques spécifiques du micro-organisme :  $\mu_{\text{opt}}$ ,  $K_0$ ,  $T_{\min}^0$ ,  $T_{\text{opt}}$ ,  $T_{\max}$ ,  $pH_{\min}^0$ ,  $pH_{\text{opt}}$ ,  $pH_{\max}$ ,  $aw_{\min}^0$ ,  $aw_{\text{opt}}$  et  $aw_{\max}$  et de paramètres spécifiques de l'aliment :  $pH$  et  $aw$ , et de son circuit de distribution : températures et durées de stockage.

Pour l'application du modèle d'exposition, nous avons fixé  $T_{\text{opt}}$ ,  $T_{\max}$ ,  $pH_{\text{opt}}$ ,  $pH_{\max}$ ,  $aw_{\text{opt}}$  et  $aw_{\max}$  à respectivement

37°C, 45,5°C, 7,1, 9,6, 0,997 et 1. Par contre, pour les autres paramètres, nous avons pris en compte l'incertitude sur leur estimation et également la variabilité dont ils font l'objet au travers de distributions de type BetaPERT modifiées (DELIGNETTE-MULLER et ROSSO, 2000) précisées dans le tableau I.

(tableau I)

### Simulations et réponses étudiées

Des simulations numériques ont été réalisées par tirages aléatoires de Monte Carlo de valeurs indépendantes dans les distributions des variables d'entrée. 50 000 itérations ont été réalisées avec le logiciel Matlab 5.2 (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). A chaque itération correspond un quadruplet de variables de sortie : nombre initial de cellules dans une portion, nombre de cellules après le stockage chez le producteur, nombre de cellules après le stockage chez le distributeur et enfin nombre de cellules ingérées par le consommateur.

### • RÉSULTATS DE L'APPRÉCIATION DE L'EXPOSITION

La figure 3 présente les résultats obtenus par simulation pour les variables de sortie. On observe que la contamination initiale des portions ingérées par le consommateur est nulle dans 81 % des cas, et que dans les 19 % de cas restant elle est comprise entre 1 et 4 cellules. Cette contamination initiale très faible est due à l'hypothèse de contamination aléatoire par *L. monocytogenes* qui n'est certainement pas représentative de l'ensemble des scénarios de contamination rencontrés dans les industries agro-alimentaires. Par exemple, lors de contamination par contact avec des surfaces souillées, la contamination peut d'emblée être massive. Il serait donc préférable de modifier le modèle d'appréciation en associant à la probabilité que les portions soient contaminées une distribution indépendante de niveaux de contamination. Cette approche, bien que préférable, reste cependant très difficile à mettre en œuvre du fait de l'absence de données expérimentales justifiant cette distribution de contamination initiale.

La contamination des portions après la phase de stockage chez le fabricant est toujours inférieure à 20 cellules. Bien que les conditions choisies dans cet exemple ne soient pas forcément représentatives des situations rencontrées sur le terrain, on peut tout de même souligner que ce résultat de moins de 20 cellules dans des portions de 30 à 70 g est cohérent avec les résultats d'analyses d'autocontrôle des industriels puisque, lorsqu'ils observent la présence de *L. monocytogenes* dans 25 g de produit, la contamination est généralement inférieure à 10 germes par g.

Le niveau de contamination important des portions après la phase de stockage chez le distributeur est dû à la durée de stockage prolongée (10 à 16 jours) et à la température relativement élevée (+3°C à +7°C). Il est intéressant de noter que 0,23 % des portions dépassent le seuil de 100 *L. monocytogenes* par g qui représente la tolérance généralement

admise aujourd'hui pour des produits à la distribution.

Au moment de la consommation, le niveau de contamination est encore augmenté mais de façon relativement restreinte du fait d'une durée de stockage chez le consommateur courte (moins de 5 jours dans 50 % des cas). Le pourcentage de portions contenant plus de 100 *L. monocytogenes* par g est cependant significativement augmenté puisqu'il est, cette fois-ci, de 1,49 %.

(fig. 3)

### • IMPACT D'OPTIONS DE MAÎTRISE SUR L'EXPOSITION À *L. MONOCYTOGENES*

#### Diminution de la durée de vie du produit

L'étude initiale était censée représenter une situation dans laquelle la durée de vie du produit était de 40 jours puisque les durées maximales de stockage chez le producteur, le distributeur et chez le consommateur étaient respectivement de 10, 16 et 14 jours. Une diminution de la durée de vie à 30 jours a été obtenue en modifiant les temps de stockage chez le producteur et chez le distributeur avec des valeurs respectivement comprises entre 2 et 6 jours et 4 et 10 jours. Le résultat des nouvelles simulations est présenté sur la figure 4, on observe une diminution notable du niveau de contamination des portions ingérées. Le pourcentage de portions contenant plus de 100 *L. monocytogenes* par g est dans ce cas de 0,56 %. En plus de ce seuil de 100 cellules par g et sans entrer dans une appréciation des effets pour laquelle de nombreux modèles de relation dose-effet ont été proposés, nous nous sommes fixés un seuil de 10<sup>6</sup> *L. monocytogenes* ingérées afin d'apprécier l'impact des mesures de gestion sur un niveau de contamination plus dangereux pour le consommateur. Le pourcentage de portions dépassant ce seuil dans l'étude initiale était de 0,37 % et il passe à 0,10 % lorsque la durée de vie est réduite à 30 jours

#### Mise en place d'un contrôle libératoire par le fabricant

La mise en place d'un contrôle libératoire systématique des lots par le fabricant avec un plan d'échantillonnage  $n = 5$ ,  $c = 0$  a pour effet de diminuer considérablement le pourcentage de portions contaminées qui passe de 19,0 % à 11,2 % (fig. 4). Par contre l'effet sur le pourcentage de portions contenant plus de 100 *L. monocytogenes* par g est plus modeste puisque celui-ci est encore de 0,92 %. L'effet sur le pourcentage de portions contenant plus de 10<sup>6</sup> *L. monocytogenes* est encore plus limité puisque celui-ci passe de 0,37 % pour la situation initiale, à seulement 0,23 % lors de la mise en place du contrôle libératoire

#### Amélioration de la maîtrise des paramètres de fabrication

Une meilleure maîtrise des paramètres de fabrication des produits par le fabricant peut se traduire, par exemple, par des valeurs de pH comprises entre 5,7 et 5,9 au lieu de 5,7 et 6,1 initialement et par une activité de l'eau comprise entre 0,95 et 0,96 au lieu de 0,95 et 0,97. Cette amélioration de la maîtrise technologique se traduit également par une forte diminution de l'exposition à *L. monocytogenes* (fig. 4) puisque la croissance du pathogène est ralentie pendant les phases de stockage. Le pourcentage de portions contenant plus de 100 *L. monocytogenes* par g passe alors à 0,08 % et le pourcentage de portions contenant plus de 10<sup>6</sup> *L. monocytogenes* passe lui à 0,006 %.

#### Information du consommateur

Les campagnes d'information des consommateurs, en particulier sur les températures de garde des aliments dans les réfrigérateurs ménagers, font également partie de la panoplie des mesures de gestion pouvant être mise en œuvre pour réduire les risques liés à la présence de micro-organismes dangereux dans les aliments. Pour évaluer l'impact de telles campagnes, la distribution initiale des températures chez le consommateur qui était encadrée par la valeur minimale de +3°C et la valeur maximale de +13°C avec une valeur médiane à +6,2°C a été remplacée par une distribution encadrée par +3°C et +10°C mais avec une médiane à +4,6°C. L'effet de cette mesure est présenté sur la figure 4. Le pourcentage de portions contenant plus de 100 *L. monocytogenes* par g reste élevé puisqu'il diminue seulement à 1,01 % ; par contre l'effet est plus marqué sur le pourcentage de portions contenant plus de 10<sup>6</sup> *L. monocytogenes* qui lui passe à 0,17 % au lieu de 0,37 %. L'impact limité de cette mesure s'explique par le fait que les durées de stockage chez le consommateur sont faibles et que l'essentiel de la croissance de *Listeria* se fait, dans notre exemple, chez le distributeur.

(fig. 4)

### • CONCLUSION

Avant de conclure sur cette étude, il est important de rappeler que les résultats obtenus dans de telles études sont spécifiques de l'aliment considéré, de son circuit de distribution et de son mode de consommation et qu'une extrapolation à d'autres situations serait tout à fait inappropriée. Cet exemple purement fictif nous a néanmoins permis de présenter la démarche d'appréciation de l'exposition alimentaire à un danger microbien. Outre le fait qu'elle permette d'apprécier cette exposition, elle permet surtout d'évaluer l'impact de mesures de gestion des risques et de les comparer sur une base objective car quantitative. Comme nous avons pu le voir, cette démarche permet de justifier les mesures de gestion des risques mise en place par les états et est également tout à fait utilisable par des industriels désireux d'évaluer l'efficacité des mesures de maîtrise des dangers mises en place dans le cadre de leur système HACCP. Cette méthode se heurte aujourd'hui encore

à certaines limites liées aux hypothèses éventuellement simplificatrices émises faute d'informations fiables sur certains phénomènes comme, par exemples, le niveau de contamination initial des aliments, l'impact des chocs stressants sur les capacités de croissance des micro-organismes ou bien encore l'importance du niveau de contami-

nation initial sur le devenir des micro-organismes. Bien que ces limites remettent en question la fiabilité des niveaux d'exposition obtenus, on peut cependant estimer que l'effet relatif des mesures de gestion est quant à lui fiable et cela justifie pleinement la mise en œuvre de telles études.

## BIBLIOGRAPHIE

- AUGUSTIN JC, CARLIER V (2000) Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int. J. Food Microbiol.*, **56**, 53-70
- AUGUSTIN JC, ROSSO L, CARLIER V (2000) A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, **57**, 169-181.
- CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE (CCFH) (1999) Principles and guidelines for the conduct of microbial risk assessment. ALINORM 99/13A appendix II.
- DELIGNETTE-MULLER ML, ROSSO L (2000) Biological variability and exposure assessment. *Int. J. Food Microbiol.*, **58**, 203-212.
- ROSSO L, BAJARD S, FLANDROIS JP, LAHELLEC C, FOURNAUD J, VEIT P (1996) Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *J. Food Prot.*, **59** (9), 944-949.
- VOSE D (2000) *Risk analysis. A quantitative guide*. 2<sup>d</sup> ed. Wiley, New York

tableau I. Variables d'entrée du modèle d'appréciation de l'exposition.

Variable	Définition	Type de distribution	Référence
$p$	proportion d'unités de 25 g contaminées	Beta (301, 2701)	arbitraire
$m$	masse de la portion ingérée (g)	BetaPERT (30, 50, 70)*	arbitraire
$T_{\min}^{\circ}$	température minimale absolue de croissance (°C)	Discrète, 24 valeurs comprises entre $-7,4^{\circ}\text{C}$ et $-0,5^{\circ}\text{C}$	Augustin et Carlier, 2000
$pH_{\min}^{\circ}$	pH minimal absolu de croissance	Discrète, 4 valeurs comprises entre 4,13 et 4,60	Augustin et Carlier, 2000
$aw_{\min}^{\circ}$	aw minimale absolue de croissance	Discrète, 8 valeurs comprises entre 0,900 et 0,945	Augustin et Carlier, 2000
$\ln K_0$	constante représentative de l'état physiologique initial de <i>L. monocytogenes</i>	BetaPERT (0,279, 0,761, 1,243)	Augustin et Carlier, 2000
$\sqrt{\mu_{\text{opt}}}$	taux de croissance optimal (h-0,5)	BetaPERT (0,894, 1,056, 1,213)	Augustin et Carlier, 2000
$pH$	pH de l'aliment	BetaPERT (5,7, 5,9, 6,1)	arbitraire
$aw$	aw de l'aliment	BetaPERT (0,95, 0,96, 0,97)	arbitraire
$T_{\text{prod}}$	température de stockage chez le producteur (°C)	BetaPERT (2, 3, 4)	arbitraire
$t_{\text{prod}}$	durée de stockage chez le producteur (jours)	BetaPERT (6, 8, 10)	arbitraire
$T_{\text{distr}}$	température de stockage chez le distributeur (°C)	BetaPERT (3, 5, 7)	arbitraire
$t_{\text{distr}}$	durée de stockage chez le distributeur (jours)	BetaPERT (10, 13, 16)	arbitraire
$T_{\text{cons}}$	température de stockage chez le consommateur (°C)	BetaPERT (3,6, 6,2, 13)	arbitraire
$t_{\text{cons}}$	durée de conservation chez le consommateur (jours)	BetaPERT (1, 5,1, 14)	arbitraire

\* paramètres des distributions BetaPERT(a, b, c) : a est la valeur minimale, b est la valeur la plus probable, c est la valeur maximale.