

## PROTOCOL VOOR HET UITVOEREN VAN CHALLENGE

### TESTEN

## MET BETREKKING TOT *LISTERIA MONOCYTOGENES*

<b>1. INLEIDING .....</b>	<b>2</b>
<b>2. REGLEMENTAIRE GRONDSLAGEN.....</b>	<b>3</b>
<b>3. INDELING VAN LEVENSMIDDELEN .....</b>	<b>3</b>
<b>4. DEFINITIE VAN EEN CHALLENGE TEST .....</b>	<b>5</b>
<b>5. PROTOCOL VAN EEN CHALLENGE TEST .....</b>	<b>6</b>
5.1. BESCHRIJVING VAN HET PRODUCT EN HET FABRICAGEPROCES .....	6
5.1.1. <i>Fabricageproces</i> .....	6
5.1.2. <i>Levensmiddel</i> .....	7
5.2. BEËNTEN VAN HET LEVENSMIDDEL .....	7
5.2.1. <i>Keuze van de stammen</i> .....	7
5.2.2. <i>Bereiding van de inoculum</i> .....	7
5.2.3. <i>Beënten van het levensmiddel</i> .....	8
5.3. GROEITEST .....	9
5.3.1. <i>Bewaaromstandigheden van het beënte levensmiddel</i> .....	9
5.3.2. <i>Aantal analyses per productpartij</i> .....	9
5.3.3. <i>Aantal partijen</i> .....	9
5.4. MICROBIOLOGISCHE PROEVEN.....	10
5.4.1. <i>Analysemethode</i> .....	10
5.4.2. <i>Weergave van de resultaten</i> .....	10
<b>6. WIJZE VAN INTERPRETEREN VAN EEN CHALLENGE TEST.....</b>	<b>11</b>
6.1. BEPERKT PROTOCOL.....	11
6.2. VOLLEDIG PROTOCOL.....	12
<b>7. BIJLAGEN .....</b>	<b>16</b>

## 1. Inleiding

Deze procedure werd op verzoek van het FAVV opgesteld door het Nationaal Referentielaboratorium microbiologie van levensmiddelen van de Université de Liège. Ze is gesteund op een advies van het Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, nl. « Avis sur la révision de l'avis 2000-SA-0094 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance (Zaak nr. 2003-SA-0362) » en houdt rekening met het advies van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV (dossier Sci Com 2005/49). Het document is een handleiding voor de tenuitvoerlegging van een aantal bepalingen met betrekking tot *Listeria monocytogenes* uit Verordening (EG) nr. 2073/2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen. Het zal door de fabrikanten worden gebruikt als handleiding om de hierna vermelde studies uit te voeren en door de inspecteurs/controleurs van het FAVV om die studies te evalueren. Er moet worden onderstreept dat de in het document vermelde richtlijnen onlosmakelijk horen bij het autocontrolesysteem (HACCP) dat in een levensmiddelenbedrijf wordt toegepast. Het document heeft meer bepaald tot doel de belangrijke punten aan te wijzen die het mogelijk maken een protocol van een groeitest of challenge test voor *L. monocytogenes* in ready-to-eat producten te evalueren.

*Listeria monocytogenes* is een (aan koeltemperaturen aangepast) psychotroop micro-organisme dat zich kan vermenigvuldigen bij een minimumtemperatuur van de  $-3^{\circ}\text{C}$ , een maximumtemperatuur van  $45^{\circ}\text{C}$ , en, optimaal, bij  $37^{\circ}\text{C}$ . De minimale wateractiviteit ( $a_w$ ) waarbij *L. monocytogenes* zich kan ontwikkelen bedraagt 0,92, wat met name overeenstemt met 11,9% NaCl. Dit micro-organisme kan zich vermenigvuldigen binnen een pH-bereik van 4,4 tot 9,4, met als optimale waarde 7,0. *L. monocytogenes* kan echter ook buiten die grenswaarden overleven.

## **2. Regelementaire grondslagen**

Deze challenge testen hebben betrekking op Verordening (EG) nr. 2073/2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen waarin voor *Listeria monocytogenes* in kant-en-klare levensmiddelen, met uitzondering van zuigelingenvoeding en voeding voor medisch gebruik, de volgende voedselveiligheidscriteria zijn vastgelegd :

A / Als het levensmiddel als voedingsbodem voor *L. monocytogenes* kan dienen :

1. een grenswaarde van 100 kolonievormende eenheden (kve/g) voor de duur van de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel, of
2. afwezig in 25 g voordat het levensmiddel de directe controle van de fabrikant heeft verlaten.

Het eerste criterium kan worden toegepast als de fabrikant tot tevredenheid van de bevoegde autoriteit kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan deze grenswaarde zal voldoen. Als de fabrikant dit niet tot tevredenheid van de bevoegde autoriteit kan aantonen, is het tweede criterium van toepassing.

B/ Als het levensmiddel niet als voedingsbodem voor *L. monocytogenes* kan dienen moet gedurende de hele houdbaarheidstermijn van het levensmiddel worden voldaan aan een grenswaarde van 100 kve/g.

## **3. Indeling van levensmiddelen**

Volgens artikel 3, punt 2 van Verordening (EG) nr. 2073/2005 moeten exploitanten van levensmiddelenbedrijven studies verrichten om na te gaan of gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de hierboven vermelde criteria wordt voldaan. Dat geldt met name voor kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor *L. monocytogenes* kunnen dienen.

Ten aanzien van de challenge test kunnen levensmiddelen worden ingedeeld in 5 categorieën (tabel I). In bijlage 1 zijn voorbeelden vermeld van levensmiddelen die tot de verschillende categorieën behoren.

Concreet slaagt men er doorgaans in de groei van *L. monocytogenes* te voorkomen door een aantal factoren met elkaar te combineren (bijvoorbeeld verlaging van de pH, van de wateractiviteit en van de temperatuur, eventueel in combinatie met het gebruik van bewaarmiddelen, zoals organische zuren, of verpakken onder gemodificeerde atmosfeer). In het document « groei en overleven van *Listeria*

*monocytogenes*: preventiemaatregelen in de voedselketen »<sup>1</sup> worden een aantal voorbeelden gegeven van combinaties die de ontwikkeling van *L. monocytogenes* beletten (bijlage 2).

Tabel 1: in samenhang met de challenge testen in aanmerking te nemen categorieën van levensmiddelen.

<u>categorie 0</u>	<p>Levensmiddelen die bij verordening (EG) nr. 2073/2005 vrijgesteld zijn van de challenge test.</p> <p>« Regelmatige testen betreffende dit criterium zijn onder normale omstandigheden niet zinvol voor de volgende kant-en-klare levensmiddelen :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- kant-en-klare levensmiddelen die een warmtebehandeling of andere be- of verwerking hebben ondergaan waarmee <i>L. monocytogenes</i> wordt geëlimineerd, wanneer na deze behandeling geen herbesmetting kan optreden, bv. producten in die in hun eindverpakking een warmtebehandeling hebben ondergaan,</li> <li>- verse, ongesneden en onverwerkte groenten en fruit, met uitzondering van gekiemde zaden,</li> <li>- brood, biscuits en soortgelijke producten,</li> <li>- water in flessen of pakken, frisdranken, bier, cider, wijn, gedistilleerde dranken en soortgelijke producten,</li> <li>- suiker, honing en zoetwaren, met inbegrip van cacao- en chocoladeproducten,</li> <li>- levende tweekleppige weekdieren. »</li> </ul>
<u>categorie 1</u>	Levensmiddelen die een proces zullen ondergaan waarbij <i>L. monocytogenes</i> in het stadium van de consumptie in voldoende mate wordt vernietigd.
<u>categorie 2</u>	Kant-en-klare levensmiddelen die bestemd zijn voor zuigelingen en kant-en-klare levensmiddelen voor medisch gebruik.
<u>categorie 3</u>	<p>Deze categorie bestaat uit :</p> <p>3.1 Levensmiddelen met fysisch-chemische eigenschappen op grond waarvan vermenigvuldiging van <i>L. monocytogenes</i> kan worden uitgesloten, nl. :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\text{pH} \leq 4,4</math> (of <math>\text{pH} \leq 4,5</math> als de verzuring wordt verkregen met behulp van melkzuur of azijnzuur) ;</li> <li>- <math>a_w \leq 0,92</math> ;</li> <li>- <math>\text{pH} \leq 5,0</math> en <math>a_w \leq 0,94</math> ;</li> <li>- bevroren of diepgevroren product.</li> </ul> <p>3.2 Levensmiddelen die minder dan 5 dagen houdbaar zijn</p> <p>3.3 Levensmiddelen waarvoor de afwezigheid van groei kan worden vermoed op grond van door een beperkte challenge test ter verificatie ondersteunde wetenschappelijke gegevens.</p>
<u>categorie 4</u>	Kant-en-klare levensmiddelen waarin <i>L. monocytogenes</i> zich kan vermengvuldigen.

<sup>1</sup> F. Devlieghere, M. Uyttendaele, Laboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie en –conservering, Universiteit Gent

#### 4. Definitie van een challenge test

Een **groeitest** of **challenge test** is een proef waarmee de toename wordt geëvalueerd van de populatie van een micro-organisme (dat doorgaans als een gevaar wordt aangemerkt) in een levensmiddel dat kunstmatig werd beënt met een bekende kweek van dat micro-organisme en dat wordt geanalyseerd in voorwaarden die overeenstemmen met het redelijkerwijs verwachte gebruik ervan. Het gaat om testen waarmee een groeipotentieel kan worden vastgesteld bij ofwel een constante temperatuur ofwel een tijd/temperatuur-profiel (simulatie van bijvoorbeeld een koudeketen met onderbreking). Het **groeipotentieel** is het verschil tussen de tiendelige logaritme van de concentratie na de groei en de tiendelige logaritme van de aanvankelijke concentratie (de duur kan de latentiefase en/of de exponentiële fase en/of de stationaire fase omvatten). Bij het vaststellen van het groeipotentieel moet rekening worden gehouden met de meetonzekerheid. Bijlage 3 bij dit advies geeft meer informatie over de meetonzekerheid van kwantitatieve microbiologische bepalingen (tellingen). Normaliter moet de meetonzekerheid worden bepaald door elk geaccrediteerd laboratorium dat tellingen doet. In de praktijk wordt vaak aangenomen dat de meetonzekerheid van een microbiologische telling gelijk is aan  $\pm 0,5$  s log-eenheden.

Levensmiddelen van categorieën 0 en 1 moeten geen challenge test ondergaan en er zijn geen wettelijke microbiologische criteria voor *Listeria monocytogenes* op van toepassing. Producten van categorie 2 moeten steeds voldoen aan het criterium « afwezig in 25 gram ». Het doel van de challenge test voor levensmiddelen van categorie 3 bestaat erin de wetenschappelijke gegevens en prognostische modellen volgens welke vermenigvuldiging van *L. monocytogenes* onmogelijk is te bevestigen. De toegepaste challenge test wordt « beperkt » genoemd. De challenge test voor levensmiddelen van categorie 4 beoogt een raming te geven van het groeipotentieel van *L. monocytogenes*. Als bijlage 4 is een beslissingsorganigram weergegeven.

Wanneer op basis van de gepubliceerde wetenschappelijke gegevens (eventueel gestaafd met prognostische modellen) wordt aangenomen dat een levensmiddel tot **categorie 3** behoort en dat levensmiddel niet beantwoordt aan de in dit document (of in Verordening (EG) nr. 2073/2005 of een andere regelgevende tekst) vermelde kenmerken met betrekking tot de pH, de wateractiviteit, het invriezen/diepvriezen of de houdbaarheidstermijn, moet absoluut worden onderzocht of in dit levensmiddel groei van *L. monocytogenes* wel onmogelijk is. Deze verificatietest bestaat uit één enkele beperkte challenge test waarbij het levensmiddel wordt beënt met *L. monocytogenes* en waarbij de concentratie van *L. monocytogenes* wordt bepaald op dag 0 en op het einde van de bewaring. Alleen wanneer geen enkele groei wordt vastgesteld (rekening houdend met de meetonzekerheid van de kwantitatieve microbiologische bepaling) is categorie 3 van toepassing.

Voor levensmiddelen van **categorie 4** moeten groeitesten worden uitgevoerd om aan te tonen dat het product de grenswaarde van 100 kve/g niet zal overschrijden tijdens de microbiologische levensduur. Als algemeen principe geldt dat pathogenen in de mate van het mogelijke afwezig moeten zijn in de voedselketen. Verordening (EG) nr. 2073/2005 (Bijlage I, Hoofdstuk 1, categorie 1.2, noot 5) stelt dat wanneer *L. monocytogenes* bij toeval toch aanwezig is, het verontreinigingsniveau dat op het einde van de productie wordt getolereerd zodanig moet zijn dat aan de in Verordening (EG) nr. 2073/2005 vermelde grenswaarde van 100 kve/g wordt voldaan op de uiterste gebruiksdatum. De tolerantiewaarde op het einde van de productie hangt af van het potentieel van *L. monocytogenes* om zich in het betreffende levensmiddel te vermenigvuldigen in de voorgeschreven bewaaromstandigheden en tijdens de voorgeschreven bewaartijd. Die groei wordt gekwantificeerd bij middel van challenge tests (waarbij de pathogeen kunstmatig in/op het levensmiddel wordt geënt), waarvan de resultaten worden gestaafd door de wetenschappelijke literatuur of voorspellingsmodellen. Als het groeipotentieel van *L. monocytogenes* niet kan worden gestaafd door de fabrikant, moet het criterium « afwezig in 25 g » worden gebruikt. Voor die levensmiddelen van categorie 4 wordt op twee punten een challenge test uitgevoerd, nl. op dag 0 (dag van het uit de productie komen) en op de uiterste gebruiksdatum, om het groeipotentieel van *L. monocytogenes* in het levensmiddel te ramen in de voorgeschreven bewaaromstandigheden. Aan de hand van dat groeipotentieel kan de tolerantiewaarde voor *L. monocytogenes* bij het uit de productie komen worden geraamd. Die tolerantiewaarde wordt enerzijds door de fabrikant gebruikt in samenhang met de autocontroles op het HACCP-systeem en anderzijds door de bevoegde autoriteit om de naleving na te gaan van het criterium uit Verordening (EG) nr. 2073/2005 (Bijlage I, Hoofdstuk 1, categorie 1.2). Het uitvoeren van een challenge test met meer meetpunten kan voor de fabrikant interessante bijkomende informatie opleveren maar is niet strikt noodzakelijk om de tolerantiewaarde vast te stellen aangezien alleen met de meetpunten dag 0 en uiterste gebruiksdatum (UGD) rekening wordt gehouden. Om daarentegen een echte groeicurve te verkrijgen, zijn ten minste 10 meetpunten vereist om op betrouwbare wijze de latentiefase en het groeipercentage<sup>2</sup> te kunnen bepalen.

## **5. Protocol van een challenge test**

### **5.1. *Beschrijving van het product en het fabricageproces***

#### **5.1.1. FABRICAGEPROCES**

Er moet een bondige beschrijving van het fabricageproces beschikbaar zijn. Die beschrijving kan worden afgeleid uit het in het bedrijf beschikbare HACCP-systeem. Zij moet de kritieke processtappen waarin verontreiniging van het levensmiddel met *L. monocytogenes* mogelijk is en die waarin *L. monocytogenes* kan groeien of kan overleven duidelijk doen uitkomen.

---

<sup>2</sup> Walker SJ and Jones JE (1993). Protocols for data generation for predictive modelling. J. Industrial Microbiology, 12, 273-276

### **5.1.2. LEVENSMIDDEL**

De kenmerken van het product moeten worden beschreven : fysisch-chemische kenmerken (pH, aw, zoutgehalte, concentratie van bewaarmiddelen), structuur, type bewaring (bevroren, diepgevroren, vers), onmiddellijke verpakking (vacuüm, onder gemodificeerde atmosfeer...). Dat geldt eveneens voor alle andere factoren die van invloed kunnen zijn op het gedrag van *L. monocytogenes* en waarmee in de test rekening moet worden gehouden. Tevens moet het voor het levensmiddel bepaalde tijd-temperatuur-profiel worden toegelicht, d.w.z. de tijd/temperatuur-combinaties (waarvan men verwacht dat ze zullen worden nageleefd) tijdens de interne opslag in het bedrijf, tijdens het vervoer, tijdens de eventuele intermediaire opslag in het distributiecentrum, tijdens de uitstalling in koeltoonbanken in de detailhandel en tijdens de bewaring bij de consument. Ook moet de maximale houdbaarheidstermijn duidelijk zijn aangeduid.

De aard van de gewoonlijk aangetroffen bijbehorende flora en de op het stuk van de consumptie redelijkerwijs voorspelbare gewoonten en hoeveelheden moeten worden vermeld. Tevens moeten de gegevens over het toezicht of de controle op het betreffende product (autocontrole in het bedrijf of de productiekolom, literatuurgegevens, bewakingsplannen) worden bijeengebracht.

## **5.2. Beënten van het levensmiddel**

### **5.2.1. KEUZE VAN DE STAMMEN**

Er worden ten minste twee bij voorkeur van het levensmiddel geïsoleerde stammen gekozen en bestudeerd. Men gebruikt bij voorkeur duidelijk geïdentificeerde isolaten waarvan de groei- en morfologiekenmerken werden bestudeerd. Het is niet altijd mogelijk een stam van het betreffende levensmiddel correct te isoleren en te identificeren. Men mag bijgevolg stammen gebruiken die geïsoleerd zijn op een gelijkaardige matrix. Het is niet nodig beide uitgekozen stammen apart te bestuderen. Na de kweek mogen de verschillende stammen met elkaar worden vermengd voordat zij op het betreffende levensmiddel worden geënt. Het is immers niet nodig voor de twee stammen afzonderlijk na te gaan of zij in het betreffende levensmiddel kunnen groeien.

### **5.2.2. BEREIDING VAN HET INOCULUM**

De kweektemperatuur wordt zodanig gekozen dat een gestandaardiseerde cellenkweek in de stationaire fase wordt verkregen zodat de beoogde aanvangsconcentratie makkelijk kan worden verkregen (kvg/g levensmiddel). Dit kan worden verkregen, bijvoorbeeld, na een kweek bij een voldoende hoge temperatuur om vermenigvuldiging van *L. monocytogenes* mogelijk te maken (bijvoorbeeld 14°C) die voldoende lang wordt aangehouden om de stationaire fase te bereiken, gevolgd door een bewaring gedurende ongeveer 12 uur bij de aanbevolen temperatuur (doorgaans 4°C voor gekoelde levensmiddelen). Er zijn dus voorafgaande studies vereist met het oog op een correcte planning en uitvoering van de challenge test.

Het aanvankelijke aantal cellen in het levensmiddel moet voldoende groot zijn om de gevolgen van de veranderlijkheid van de groei als gevolg van geringe hoeveelheden inoculum te beperken. De afzonderlijke cellen vertonen immers een grote veranderlijkheid wat de lengte van de latentiefase betreft<sup>3</sup>. Men moet ten minste 100 tot 1000 cellen enten per in de challenge test gebruikte portie levensmiddel. Het enten van te grote aantallen *L. monocytogenes* is evenmin aan te raden omdat dit weinig realistisch is in vergelijking met de in de spontaan verontreinigde monsters gevonden verontreinigingsniveaus en omdat de competitieve flora dan volledig gemaskeerd wordt en men vaak uitkomt op een overschatting van het groeipotentieel. Het is aan te raden een realistische hoeveelheid inoculum te kiezen waarbij toch aantallen worden bekomen die geteld kunnen worden (i.e. ten minste 10 kve/g). Om een lagere aanvangsconcentratie dan 100 kve/g te verkrijgen, moet de omvang van de portie levensmiddel die wordt getest met zorg worden gekozen. Bovendien moet zowel vóór als onmiddellijk na het beënten de *L. monocytogenes*-concentratie van het inoculum en van het levensmiddel worden bepaald aangezien het altijd mogelijk is dat reeds voor de beënting *L. monocytogenes*-cellen in het levensmiddel aanwezig zijn.

### 5.2.3. BEËNTEN VAN HET LEVENSMIDDEL

De beënting moet een zo goed mogelijk simulatie zijn van de omstandigheden bij spontane verontreiniging. In tabel II worden een aantal wijzen van beënten weergegeven. Bij het beënten worden de structuur, de samenstelling, de fysisch-chemische eigenschappen, de spontaan aanwezige microbenflora en de onmiddellijke verpakking van het levensmiddel zo weinig mogelijk gewijzigd. Bovendien moet worden gezorgd voor een zo homogeen mogelijke spreiding over de voor analyse bemonsterde zones. De hoeveelheid inoculum moet voldoende groot zijn om een dergelijke goede spreiding mogelijk te maken maar mag ook niet te groot zijn om de eigenschappen van het levensmiddel als voedingsbodem niet te wijzigen.

Tabel II. Wijzen van beënten

Entplaats(en)	Gesimuleerde spontane verontreiniging	Voorbeeld
In de diepte en oppervlakkig	Levensmiddelen bereid door vermenging van meerdere grondstoffen waarvan er een verontreinigd kan zijn	Gemengde salade, gehakt product, verdeeld product
Oppervlakkig	Postcontaminatie na Listeria dodende behandeling	Pastei, ham

<sup>3</sup> François K (2005). Effect of environmental and precultural conditions on the lag phase of *Listeria monocytogenes* at the individual cell level. PhD dissertation, Ghent University, Laboratory of Food Microbiology and Preservation

### **5.3. Groeitest**

#### **5.3.1. BEWAAROMSTANDIGHEDEN VAN BEËNT LEVENSMIDDEL**

De tijdens de groeitest toegepaste bewaaromstandigheden moeten voldoen aan de reglementaire verplichtingen en de voorwaarden die voor het in de handel gebrachte product gelden tot bij het eindgebruik.

De groeitest wordt ofwel bij een vaste ofwel bij veranderlijke temperatuur uitgevoerd. In het eerste geval wordt gedurende de hele houdbaarheidstermijn een, gerechtvaardigde, gelijke temperatuur aangehouden die moet overeenstemmen met de meest waarschijnlijke bewaar temperatuur bij totale beheersing van de koudeketen tot bij de consumptie.

In het tweede geval moet een tijd / temperatuur – profiel worden vastgelegd. De duur en de temperatuur van elke levensfase van het product (waarbij rekening wordt gehouden met de verschillende mogelijke onderbrekingen van de koudeketen) moeten worden gerechtvaardigd en worden gekozen met in aanmerkingneming van de voor de bacteriegroei gunstigste realistische voorwaarden. Dat tijd / temperatuur-profiel moet gestandaardiseerd zijn. Bij ontstentenis van een toe te passen internationale norm, wordt het profiel zo gekozen dat het levensmiddel gedurende 1/3 van de duur van de challenge test beënt is bij een temperatuur  $T_1$ , en gedurende 2/3 van de duur bij een temperatuur  $T_2$ , waarbij  $T_1$  de temperatuur is die heerst bij de fabrikant (interne opslag) of de wettelijke bewaar temperatuur en  $T_2$  de gemiddelde temperatuur in een huishoudkoelkast in België (die bijv. kan worden geraamd op grond van gegevens uit de enquête naar eetgewoonten). De naleving van de bewaar temperaturen moet door het kwaliteitsborgingssysteem van het laboratorium worden gegarandeerd.

#### **5.3.2. AANTAL ANALYSES PER PRODUCTPARTIJ**

Het doel bestaat erin de toename van de populatie van *L. monocytogenes* gedurende de bewaring te evalueren. Om rekening te kunnen houden met de eventuele heterogeniteit binnen een enkele partij moeten per partij ten minste twee eenheden worden getest, d.w.z. dat voor elke partij die wordt onderzocht gelijklopend twee groeitesten moeten worden uitgevoerd, met analyse op dag 0 en op de uiterste gebruiksdatum.

#### **5.3.3. AANTAL PARTIJEN**

Het aantal geteste partijen moet des te groter zijn naarmate de fabricagepartijen onderling heterogener zijn, met een minimum van twee partijen voor beperkte challenge tests waarbij wordt nagegaan of een levensmiddel wel tot categorie 3 behoort, of met een minimum van drie onderzochte partijen om de groeimogelijkheden van *L. monocytogenes* in een levensmiddel van categorie 4 te bepalen.

Het aantal challenge tests moet worden verhoogd al naargelang van de mate van heterogeniteit binnen een enkele partij en tussen de partijen onderling, van de mate waarin de partij wel of niet geldt als

een “worst case scenario” van het levensmiddel, van de veiligheidsmarge voor de op dag 0 vastgestelde tolerantiewaarde en van de mate waarin het HACCP-plan in het bedrijf is ingevoerd en wordt geverifieerd (zie voorbeelden in punt 6).

## **5.4. Microbiologische proeven**

### **5.4.1. ANALYSEMETHODE**

De analysemethode (tellen van *Listeria monocytogenes*) moet vermeld staan op de lijst van door het FAVV erkende methoden. Het laboratorium dat de tellingen van *L. monocytogenes* verricht moet voor die parameter door het FAVV erkend zijn. Daar de getelde aantallen *L. monocytogenes* gelijk zijn aan 10 tot 100 kve/g, moeten de tellingen worden uitgevoerd in overeenstemming met Verordening (EG) nr. 2073/2005 (Bijlage I, Hoofdstuk 1, noot 6), waarbij 1 ml wordt uitgeplaat op 3 petrischalen van 90 mm diameter of op 1 petrischaal van diameter 140 mm.

### **5.4.2. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN**

Voor elke partij moeten alle op elk analysepunt verkregen metingen worden verstrekt (eventueel in grafische vorm) alsook de *gemiddelde waarden* voor elk analysepunt. Al die grafische voorstellingen en al die berekeningen moeten worden uitgevoerd op gegevens in logaritme grondtal 10 van het aantal kve/g. Voor elke partij bestaat het groeipotentieel uit het verschil tussen het hoogste resultaat in logaritme grondtal 10 van de op de uiterste gebruiksdatum verrichte telling en het laagste resultaat van de op dag 0 verrichte telling.

Het aantal bewaardagen tussen elk analysepunt en de overeenstemmende groeipotentieën moeten duidelijk worden aangeduid. Voor de testen tijdens welke meerdere temperaturen worden gehanteerd, moet het thermische scenario van de challenge test worden verstrekt in de vorm van een grafiek en/of tabel. Alle resultaten moeten toegankelijk zijn. De interpretatie van de resultaten moet worden toevertrouwd aan een gekwalificeerd microbioloog.

## 6. Wijze van interpreteren van een challenge test

### 6.1. *Beperkt protocol*

Bij de uitvoering van een beperkte challenge test voor een levensmiddel van categorie 3.3 kan men op dag 0 en op de uiterste gebruiksdatum (UGD) de volgende meetpunten verkrijgen :

#### Geval 1

partij	dag	concentratie (kve/g)	concentratie (log <sub>10</sub> kve/g)	groeipotentieel UGD <sub>max</sub> - dag 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> kve/g)
1	0	40	1,60	0,40
		60	1,78	
	UGD	100	2,00	
		20	1,30	
2	0	50	1,70	0,12
		30	1,48	
	UGD	30	1,48	
		40	1,60	

#### Geval 2

partij	dag	concentratie (kve/g)	concentratie (log <sub>10</sub> kve/g)	groeipotentieel UGD <sub>max</sub> - dag 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> kve/g)
1	0	50	1,70	0,38
		70	1,85	
	UGD	30	1,48	
		120	2,08	
2	0	40	1,60	0,40
		50	1,70	
	UGD	100	2,00	
		60	1,78	

In beide voorbeelden is het verschil tussen de tellingen op de uiterste gebruiksdatum en die op dag 0 nooit groter dan 0,5 log-eenheden. De veranderingen in de waarde van de tellingen moeten misschien worden toegeschreven aan de meetonzekerheid bij de microbiologische bepaling en niet aan de groei/verdwijning van de pathogeen. Deze resultaten bevestigen dat het levensmiddel tot categorie 3 behoort, wat betekent dat het criterium « < 100 kve/g » mag worden gebruikt zodra het uit productie komt en gedurende de volledige houdbaarheidstermijn.

Geval3

partij	dag	concentratie (kve/g)	concentratie (log <sub>10</sub> kve/g)	groeipotentieel UGD <sub>max</sub> - dag 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> kve/g)
1	0	50	1,70	<b>0,52</b>
		30	1,48	
	UGD	80	1,90	
		100	2,00	
2	0	60	1,78	0,30
		70	1,85	
	UGD	80	1,90	
		120	2,08	

In dit geval is het verschil voor de eerste geteste partij groter dan 0,5 log-eenheden. Groei van *L. monocytogenes* is dus mogelijk. Bijgevolg moet het betreffende levensmiddel worden ingedeeld in categorie 4, wat betekent dat een volledige challenge test moet worden uitgevoerd (zie verder).

**6.2. Volledig protocol**

Hierna zijn een aantal voorbeelden weergegeven waarbij 3 partijen van een levensmiddel een challenge test ondergaan die steeds in tweevoud wordt uitgevoerd (= op 2 eenheden per partij). Dat betekent dat men in totaal ten minste 6 waarden van meetpunten op dag 0 en op het einde van de houdbaarheidstermijn verkrijgt. Wanneer reeds een beperkte challenge test werd uitgevoerd, mogen de waarden daarvan voor het volledige protocol behouden blijven.

Geval 1

partij	dag	concentratie (kve/g)	concentratie (log <sub>10</sub> kve/g)	groeipotentieel UGD <sub>max</sub> - dag 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> kve/g)
1	0	30	1,48	1,28
		40	1,60	
	UGD	570	2,76	
		280	2,45	
2	0	50	1,70	<b>2,02</b>
		40	1,60	
	UGD	1300	3,11	
		4200	3,62	
3	0	30	1,48	1,48
		60	1,78	
	UGD	740	2,87	
		920	2,96	

De resultaten moeten als volgt worden geïnterpreteerd :

- Het grootste verschil dat wordt vastgesteld tussen de tellingen op de uiterste gebruiksdatum en op dag 0 bedraagt 2,02 log-eenheden voor partij 2.
- Uit tabel III kan de tolerantiewaarde op dag 0 worden afgeleid uit het grootste vastgestelde verschil. In dit voorbeeld (grootste vastgesteld verschil van 2,02 log-eenheden) is de tolerantiewaarde « afwezig in 10 g ». Bij gebruik van het grootste vastgestelde verschil (in plaats van het gemiddelde) kan rekening worden gehouden met het « worst case scenario ».
- Wanneer bij een controle door de fabrikant of de bevoegde autoriteit de aanwezigheid van *L. monocytogenes* in 10 g wordt vastgesteld op dag 0, bestaat de kans dat de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel wordt overschreden. De voedselveiligheid van dat levensmiddel kan dan niet worden gegarandeerd.

Tabel III. Bepaling van de tolerantiewaarde op dag 0 al naargelang van het grootste vastgestelde verschil tussen de waarde op de UGD en de waarde op dag 0.

Grootste vastgesteld verschil (log <sub>10</sub> (kve/g))	Tolerantiewaarde op dag 0
Tussen -1,00 en 0,00	Afwezig in 0.01 g of 100 kve/g
Tussen 0,00 en 0,99	Afwezig in 0.1 g
Tussen 1,00 en 1,99	Afwezig in 1 g
Tussen 2,00 en 2,99	Afwezig in 10 g
Meer dan 2,99	Afwezig in 25 g

#### Geval 2

partij	dag	concentratie (kve/g)	concentratie (log <sub>10</sub> kve/g)	groeipotentieel UGD <sub>max</sub> - dag 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> kve/g)
1	0	30	1,48	1,28
		40	1,60	
	UGD	570	2,76	
		280	2,45	
2	0	50	1,70	1,51
		40	1,60	
	UGD	1300	3,11	
		420	2,62	
3	0	30	1,48	1,49
		60	1,78	
	UGD	740	2,87	
		920	2,96	

De resultaten kunnen als volgt worden geïnterpreteerd :

- Het grootste vastgestelde verschil tussen de tellingen op de UGD en op dag 0 bedraagt 1,51 log-eenheden.
- Aan de hand van tabel III kan een tolerantiewaarde “ *L. monocytogenes* afwezig in 1 g” worden afgeleid.
- Wanneer bij controle door de fabrikant of de autoriteit de aanwezigheid van *L. monocytogenes* in 1 g wordt vastgesteld op dag 0, betekent dit dat de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel kan worden overschreden en dat zich een probleem met de voedselveiligheid kan voordoen.

### Geval 3

partij	dag	concentratie (kve/g)	concentratie (log <sub>10</sub> kve/g)	groeipotentieel UGD <sub>max</sub> - dag 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> kve/g)
1	0	30	1,48	<b>0,60</b>
		40	1,60	
	UGD	120	2,08	
		80	1,90	
2	0	50	1,70	0,18
		40	1,60	
	UGD	30	1,48	
		60	1,78	
3	0	30	1,48	0,47
		60	1,78	
	UGD	90	1,95	
		80	1,90	

De resultaten kunnen als volgt worden geïnterpreteerd :

- Het grootste vastgestelde verschil tussen de tellingen op de uiterste gebruiksdatum en op dag 0 bedraagt 0,6 log-eenheden.
- Aan de hand van tabel III kan een tolerantiewaarde “ *L. monocytogenes* afwezig in 0,1 g” worden afgeleid.
- Wanneer bij controle door de fabrikant of de autoriteit de aanwezigheid van *L. monocytogenes* in 0,1 g wordt vastgesteld op dag 0, betekent dit dat de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn kan worden overschreden en dat zich een probleem met de voedselveiligheid kan voordoen.

#### Geval 4

partij	dag	concentratie (kve/g)	concentratie (log <sub>10</sub> kve/g)	groeipotentieel UGD <sub>max</sub> - dag 0 <sub>min</sub> (log <sub>10</sub> kve/g)
1	0	40	1,60	<b>0,40</b>
		40	1,60	
	UGD	80	1,90	
		100	2,00	
2	0	50	1,70	0,25
		40	1,60	
	UG	30	1,48	
		70	1,85	
3	0	30	1,48	0,22
		60	1,78	
	UGD	40	1,60	
		50	1,70	

De resultaten kunnen als volgt worden geïnterpreteerd :

- Het grootste vastgestelde verschil tussen de tellingen op de uiterste gebruiksdatum en op dag 0 bedraagt 0,40 log-eenheden.
- Aan de hand van tabel III kan een tolerantiewaarde “ *L. monocytogenes* afwezig ub 0,1 g” worden afgeleid.
- Wanneer bij controle door de fabrikant of de autoriteit de aanwezigheid van *L. monocytogenes* in 0,1 g wordt vastgesteld op dag 0, betekent dit dat de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel kan worden overschreden en dat zich een probleem met de voedselveiligheid kan voordoen.

In verband met dit laatste voorbeeld kan worden aangestipt dat het grootste vastgestelde verschil van dezelfde grootteorde is als dat in de voorbeelden voor de beperkte challenge tests voor levensmiddelen van categorie 3. Daaruit mag echter niet worden besloten dat een levensmiddel van categorie 4 in categorie 3 mag worden ingedeeld als het grootste vastgestelde verschil laag genoeg is (of zelfs negatief). In tegenstelling tot levensmiddelen van categorie 4 bestaan er voor categorie 3 immers gepubliceerde wetenschappelijke gegevens waaruit blijkt dat geen vermenigvuldiging mogelijk is.

#### Opmerkingen

Als de fabrikant de uit de challenge tests afgeleide tolerantiewaarde onrealistisch vindt, kan hij ervoor kiezen de voedselveiligheid op het einde van de houdbaarheidstermijn te garanderen door de houdbaarheidstermijn van het levensmiddel in te korten of door de formulering van het levensmiddel of de bewaaromstandigheden zo te wijzigen dat de groei van *L. monocytogenes* beter wordt beheerst. In dat geval moeten nieuwe challenge tests worden uitgevoerd om voor *L. monocytogenes* een aangepaste tolerantiewaarde op dag 0 vast te stellen.

## 7. Bijlagen

Bijlage 1: Groei en overleven van *Listeria monocytogenes*: preventiemaatregelen in de voedselketen (F. Devlieghere, M. Uyttendaele, Laboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie en –conservering, Universiteit Gent)

## Bijlage 2: Meetonzekerheid van kwantitatieve microbiologische bepalingen

In verband met de resultaten van microbentellingen in levensmiddelen kan de meetonzekerheid worden omschreven als een grootte die de mogelijke variatie rond het analyseresultaat aangeeft. De bepaling van de meetonzekerheid is voor geaccrediteerde laboratoria vereist en wordt met name gebruikt om uit te maken of de door verschillende laboratoria op eenzelfde monster gedane metingen vergelijkbaar zijn en of, wanneer het meetresultaat met een grenswaarde wordt vergeleken, met een welbepaalde zekerheid aan die grenswaarde wordt voldaan of dat zij wordt overschreden. In de praktijk wordt vaak aangenomen dat de meetonzekerheid van een kwantitatieve microbiologische bepaling (telling) gelijk is aan  $\pm 0,5$  log-eenheden (wat proefsgewijs ook werd aangetoond op basis van de intralaboratorium herhaalbaarheid naar aanleiding van het uitwerken van norm ISO TS 19036 dienaangaande). Dat betekent dat men, bijv. in het geval van een analyseresultaat voor *L. monocytogenes* van 60 kve/g (log 1.78), bij een nieuwe analyse vanwege de meetonzekerheid een resultaat zal krijgen dat begrepen is tussen 1,28 en 2,28 log-eenheden, of tussen 19 en 190 kve/g. In de praktijk betekent dit dat er geen sprake is van groei zolang geen 2 vermenigvuldigingen hebben plaatsgevonden (2 vermenigvuldigingen van *L. monocytogenes* bij 60 kve/g zou immers betekenen dat men een waarde vindt van 60→120→240 kvec/g).

Een belangrijke opmerking hierbij is dat in de ontwerp technische specificatie ISO TS 19036 wordt vermeld dat zij niet geldt voor de bepaling van de meetonzekerheid voor kleine concentraties micro-organismen. "Kleine concentraties" worden in dit verband omschreven als concentraties die resulteren in minder dan 10 kolonies, geteld op ten minste 1 petrischaal, wat normaliter overeenkomt met minder dan 100 of 1000 kve/g of kve/ml product (zie norm ISO 7218: Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations). Wat de in dit advies beschreven challenge tests betreft, gaat het meestal om lage concentraties micro-organismen (zie hierboven). Toch blijft de meetonzekerheid van 0,5 log-eenheden gelden bij de interpretatie van de resultaten van de challenge tests voor levensmiddelen van categorie 3, tot wanneer een betere raming van de meetonzekerheid (of een methodologie om deze raming te doen) voor lage concentraties beschikbaar is.

### Bijlage 3: Beslissingsorganigram voor een welbepaald levensmiddel

