

Appréciation des risques microbiologiques

par Marie Cornu*, Hélène Bergis*, Nicolas Miconnet*, Marie-Laure Delignette-Muller**, Annie Beaufort*

Les risques alimentaires encourus par la population doivent être gérés dans le cadre d'une analyse scientifique solide. La démarche présentée dans cet article propose de mesurer ces risques, pour leur évaluation préventive, et pour assurer une bonne protection des consommateurs.

La notion d'appréciation scientifique des risques appliquée aux denrées alimentaires remonte au début des années 1990. En effet, l'accord sur les mesures sanitaires et phytosanitaires, signé en 1994 lors de la création de l'organisation mondiale du commerce (OMC), imposait déjà cette notion visant à protéger la santé et la vie des consommateurs. C'est un domaine, actuellement en évolution rapide, qui fait toujours l'objet de nombreuses discussions dans les instances internationales telles que le *Codex Alimentarius*.

Le domaine de l'analyse des risques microbiologiques, plus particulièrement

sa composante scientifique, l'appréciation quantitative des risques (AQR), est actuellement en plein développement [1, 2, 3]. Ainsi, des organisations internationales (FAO¹, OMS²...) ou nationales (FDA³, agences de sécurité

(*) Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Laboratoire d'études et de recherches pour l'alimentation collective, 94 Maisons-Alfort
(**) Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 69 Marcy l'Etoile

(1) FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

(2) OMS: Organisation mondiale de la Santé

(3) FDA: Food and Drug Administration (Agence américaine des aliments et drogues)

Résumé

Les risques sanitaires liés à la consommation d'aliments contaminés par des micro-organismes pathogènes peuvent être modélisés dans le cadre des appréciations quantitatives des risques (AQR). Dans une première partie, quelques définitions et concepts généraux relatifs aux AQR sont présentés. Les spécificités liées aux produits réfrigérés, et plus particulièrement la croissance microbienne au cours de la chaîne du froid, sont approfondies. Puis, après une présentation générale relative à différentes AQR, les résultats des principales étapes de deux d'entre elles sont exposés: une AQR de listériose par consommation de saumon et de truite arc-en-ciel fumés ou gravlaks et une AQR de maladie due à *Escherichia coli* O157:H7 par consommation de hamburgers. Enfin, est exposé un projet, initié par l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments), d'appréciation de l'exposition à *Listeria monocytogenes* pour trois aliments réfrigérés. Les particularités de ce projet liées aux données et aux méthodes statistiques utilisées sont notamment présentées.

Abstract

Sanitary risks linked to the consumption of food contaminated by infectious micro-organisms can be modelled through quantitative risk assessments (QRA). In a first part, some definitions and general concepts about QRA are presented. Specificities of chilled food products, such as microbial growth along the chill chain, are deepened. Then, after a general presentation about several QRA, the results of the major stages about two of them are shown: a QRA for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout and a QRA for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. Last, an on-going research project, initiated by Afssa, is presented. It concerns *Listeria monocytogenes* in three chilled ready-to-eat products. Specificities of this project, such as sources of data and statistical methods chosen, are presented.

sanitaire...) publient depuis quelques années des modèles permettant de décrire l'ensemble des facteurs contribuant au risque d'infection alimentaire. La plupart de ces AQR sont spécifiques à un micro-organisme et à une catégorie d'aliments (exemples : *Escherichia coli* O157:H7 dans le hamburger ou *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé). Les différentes possibilités de (re)contamination du produit, de croissance et d'inactivation microbiennes y sont généralement envisagées "de la fourche à la fourchette", c'est-à-dire de la production primaire (élevage, agriculture...) à la consommation.

Après une présentation générale de ce domaine, quelques applications seront détaillées.

Appréciation des risques microbiologiques

Définitions

L'appréciation quantitative des risques est un domaine dans lequel la terminologie a une importance non négligeable. Ainsi, le terme "danger alimentaire" désigne un agent biologique, chimique ou physique susceptible d'être présent dans la denrée alimentaire considérée et d'avoir un effet néfaste sur le consommateur. Dans le cadre de cet article, les dangers considérés sont des micro-organismes pathogènes. Le terme "risque" intègre à la fois des informations sur la probabilité de l'effet néfaste et sur sa gravité, du fait de la présence d'un ou de plusieurs dangers dans un aliment.

La figure 1 présente le schéma général de l'analyse des risques (risk analysis), qui comprend la phase d'appréciation des risques (risk assessment), mais aussi les phases de gestion des risques (risk management) et de communication sur les risques (risk communication). La séparation fonctionnelle entre l'appréciation des risques et la gestion des risques permet de garantir l'impartialité du processus d'appréciation des risques.

Cependant, certaines interactions sont nécessaires entre appréciation et gestion des risques pour garantir une approche exhaustive.

L'appréciation des risques, phase scientifique de l'analyse des risques, est elle-

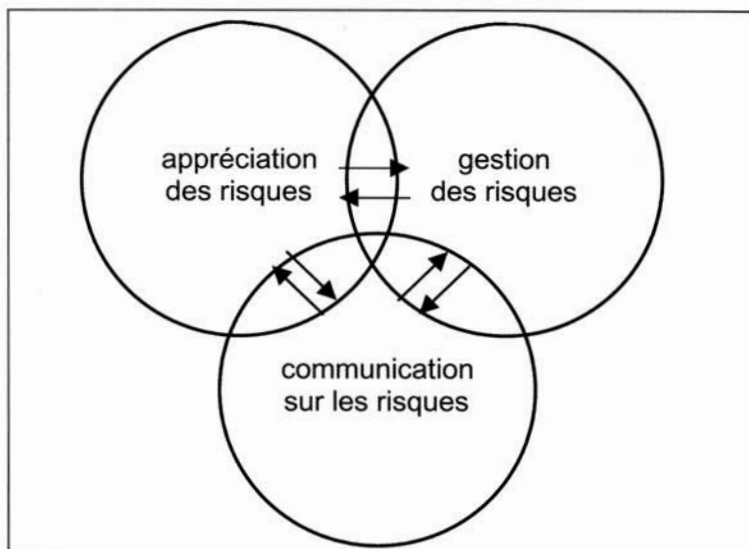


Figure 1. Représentation schématique de l'analyse de risque avec les phases d'appréciation des risques (risk assessment), de gestion des risques (risk management) et de communication sur les risques (risk communication).

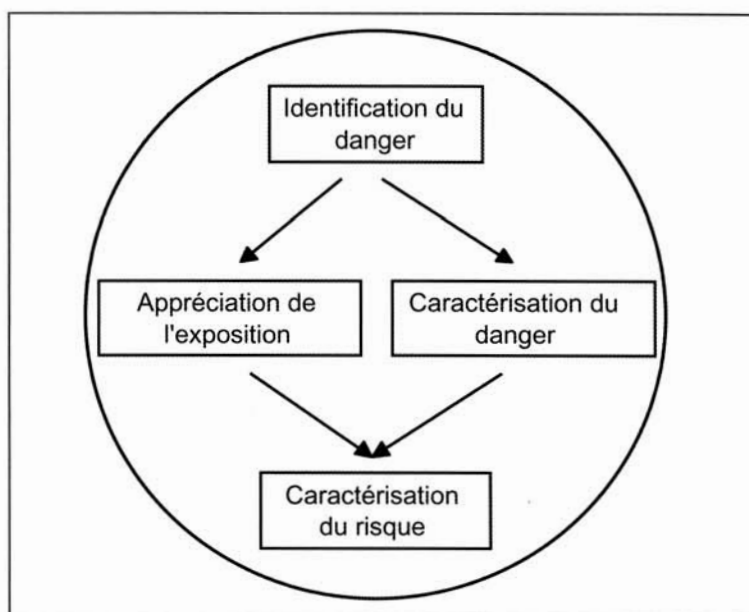


Figure 2. Représentation schématique d'une appréciation de risque divisée en quatre parties: l'identification du danger (hazard identification), l'appréciation de l'exposition (exposure assessment), la caractérisation du danger (hazard characterization) et la caractérisation du risque (risk characterization).

même classiquement divisée en quatre parties (voir figure 2): l'identification des dangers (hazard identification), l'appréciation de l'exposition (exposure assessment), la caractérisation des dangers (hazard characterization) et la caractérisation des risques (risk characterization).

L'identification des dangers est une phase préalable d'étude du danger. Il s'agit d'études d'épidémiologie, de microbio-

logie clinique et de microbiologie alimentaire visant à améliorer les connaissances sur le micro-organisme pathogène considéré, sa présence et son comportement dans les aliments considérés et la pathologie associée. Cette identification est essentiellement un processus qualitatif.

L'appréciation de l'exposition a pour but d'estimer l'exposition, qui est égale

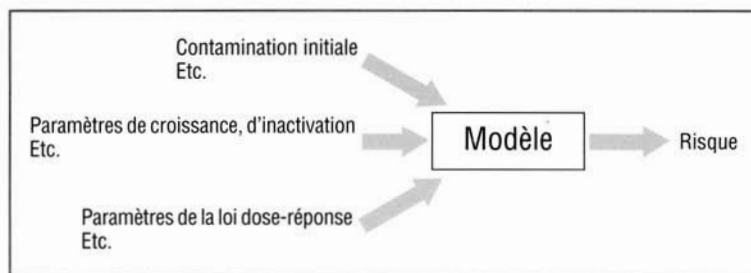


Figure 3. Représentation schématique d'un modèle d'appréciation de risque. Les variables d'entrée du modèle sont à gauche et la variable de sortie (le risque) est à droite.

à la "dose" de micro-organismes pathogènes ingérés par les consommateurs, et qui dépend donc de la contamination et de la consommation des aliments considérés. Cette étape inclut la détermination de la proportion d'aliments contaminés par le danger considéré et, le cas échéant, des niveaux de contamination au moment de la consommation, mais aussi la collecte de données sur la fréquence de consommation du produit considéré et sur les quantités consommées en un repas ("portions"). De plus, il est très utile que l'appréciation de l'exposition décrive la chaîne alimentaire dans son intégralité, si possible de la production à la consommation, ou "de la fourche à la fourchette". L'évolution de la contamination des produits tout au long de la chaîne est alors modélisée en prenant en compte les contaminations croisées et recontaminations, le développement de micro-organisme au cours des phases de stockage ou de transport, sa mortalité au cours des phases d'inactivation, et sa dilution ou sa concentration au

cours du process. La croissance microbienne, au cours de la chaîne du froid, est plus particulièrement approfondie plus loin.

La caractérisation des dangers fournit une description de la gravité des effets néfastes pouvant résulter de l'ingestion d'un micro-organisme présent dans un aliment. La loi dose-réponse permet de quantifier la probabilité d'infection, voire de maladie, en fonction de la dose ingérée, c'est-à-dire de l'exposition. Les deux modèles principalement utilisés pour la caractérisation des dangers microbiens sont le modèle exponentiel, à un paramètre, noté R et spécifique du micro-organisme considéré, et le modèle Weibull-Gamma, à deux paramètres. Ces paramètres sont estimés à partir de données expérimentales ou d'investigations épidémiologiques.

Ces deux modèles ont pour point commun de reposer sur l'hypothèse que chaque cellule pathogène a une probabilité très faible, mais non nulle, d'infecter le consommateur. Ainsi, il n'y a

pas, au sens strict, de seuil infectieux puisqu'une seule cellule suffit théoriquement à induire une infection, mais avec une probabilité très faible. Dans le cas du modèle exponentiel de loi dose-réponse, cette probabilité d'infection par une cellule est égal au paramètre R.

Enfin, la caractérisation des risques consiste à intégrer le résultat des deux étapes précédentes en effectuant une estimation du risque. Le résultat peut, par exemple, être exprimé sous la forme d'un risque individuel ou, à l'échelle d'une population, d'un nombre annuel de malades. Cette étape doit prendre en compte les facteurs d'incertitudes et de variabilité associés au résultat final.

Incertitude et variabilité

Un modèle d'appréciation de risque permet d'estimer le risque à partir d'un grand nombre de variables d'entrée. Ces variables d'entrée sont par exemple : la contamination initiale, les paramètres relatifs à l'évolution de la contamination jusqu'au stade de la consommation (paramètres de croissance et de mortalité microbiennes dans le produit), la portion consommée et les paramètres caractérisant la relation dose-réponse (voir figure 3).

Ces appréciations peuvent être ponctuelles : à chaque variable d'entrée est attribuée une valeur unique (par exemple la moyenne, ou la valeur la plus pessimiste), et une seule valeur de risque est alors obtenue en sortie. Néanmoins, ces appréciations ne couvrent pas l'intégra-

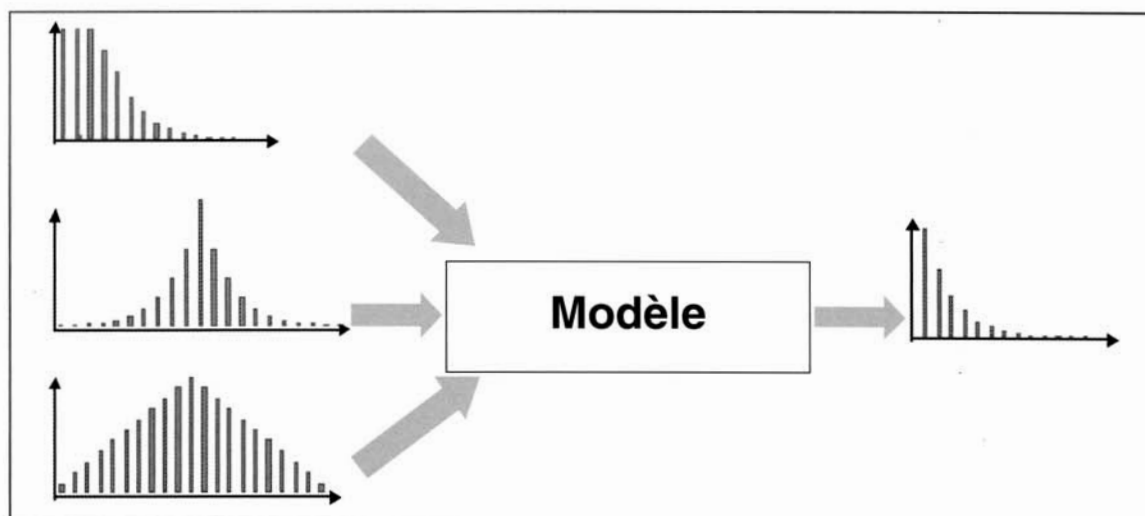


Figure 4. Représentation schématique d'une simulation de Monte Carlo. A chaque variable d'entrée du modèle est associée non pas une valeur ponctuelle mais une distribution représentant la variabilité et/ou l'incertitude sur cette variable.

lité des possibilités. L'estimation d'un risque à partir des paramètres moyens ne nous renseigne pas beaucoup sur les cas les plus rares. Une telle estimation aboutit d'ailleurs souvent, de façon erronée, à un risque nul. À l'inverse, l'estimation qui correspondrait à une combinaison des hypothèses les plus pessimistes est si peu probable qu'elle présente également peu d'intérêt. Elle aboutit le plus souvent à un risque très surestimé.

C'est pourquoi il est indispensable de recourir aux estimations probabilistes en attribuant à chaque variable d'entrée, non pas une valeur unique, mais une distribution qui traduit la variabilité (hétérogénéité des aliments, des micro-organismes, des consommateurs etc.). Des méthodes de simulations numériques de type Monte Carlo sont alors utilisées pour calculer, à partir des distributions d'entrée, la distribution du risque en sortie du modèle (voir figure 4). Il peut également être utile de représenter notre manque de connaissances, c'est-à-dire notre incertitude, sur les variables d'entrée. Une approche consiste à modéliser par des distributions l'incertitude sur les paramètres des distributions décrivant la variabilité de chaque variable d'entrée. On a ainsi deux niveaux de distributions et de paramètres. Une telle approche est relativement lourde, mais permet de connaître en sortie l'incertitude sur la distribution du risque.

Croissance microbienne et chaîne du froid

Effet du froid sur la croissance microbienne

La plupart des aliments sur lesquels ont porté les appréciations de risque publiées à ce jour sont des aliments réfrigérés. Le recours au froid constitue une pratique courante pour assurer un ralentissement de l'activité microbienne et prolonger ainsi les durées de conservation des aliments, de quelques jours à quelques semaines.

Néanmoins, si une microflore est initialement présente, sa survie voire son développement sont possibles au cours de la conservation en froid positif. La température est, en effet, un facteur important du comportement des micro-organismes. Ainsi, l'exposition à une température basse entraîne un ralentissement de la

multiplication microbienne jusqu'à une température, dite minimale, en dessous de laquelle le micro-organisme ne peut plus se multiplier. Cet effet du froid peut, en grande partie, s'expliquer par un ralentissement de l'activité métabolique, qui est contrôlée par des systèmes enzymatiques dépendants de la température. Le froid entraîne également des modifications de la biochimie microbienne, par exemple la modification des acides gras.

En ce qui concerne la chaîne du froid, les données d'entrée d'un modèle d'analyse de risque sont donc, d'une part, des données microbiologiques (paramètres de croissance des micro-organismes en fonction de la température) et, d'autre part, des données thermiques (couples temps-température). L'humidité de surface, son pH... peuvent également être des paramètres à prendre en compte.

Données microbiologiques

Les données microbiologiques nécessaires à une appréciation des risques peuvent provenir de tests de croissance (ou test d'épreuve en référence à l'expression anglo-saxonne challenge test). Il s'agit d'expériences réalisées sur des denrées contaminées artificiellement à partir d'une culture de micro-organismes caractérisés. La mise en œuvre d'un test de croissance est lourde, fastidieuse et coûteuse et il n'est pas envisageable de tester l'ensemble des conditions prévisibles (tous les profils thermiques plausibles, toutes les formulations envisageables etc.) De plus, les résultats sont entachés d'une incertitude importante.

C'est pour palier ces faiblesses que la microbiologie prévisionnelle a été développée. Ces modèles permettent de décrire et de prédire l'évolution d'une flore microbienne au cours du temps en fonction de l'effet des facteurs environnementaux, dont la température et la physico-chimie de l'aliment. Leur développement remonte au début des années 1980, et, depuis une dizaine d'années, certains de ces modèles ont été intégrés dans des logiciels facilement utilisables. L'exemple le plus connu est le logiciel américain Pathogen Modeling Program, distribué gratuitement sur Internet. On peut néanmoins regretter que les conditions expérimentales, explorées pour la détermination des modèles mathématiques de ces logiciels, soient assez éloignées des conditions rencontrées dans

l'aliment. Actuellement, de nombreux développements sont en cours et, d'ici quelques années, sont attendus des logiciels fonctionnant avec des modèles plus réalistes, réellement validés par des tests de croissance dans l'aliment.

Ces modèles permettent donc d'évaluer *a priori* l'évolution microbiologique probable d'un produit, dans des conditions prévisibles de son cycle de vie. Même si cette modélisation mathématique se heurte encore au manque de connaissances, en termes de physiologie microbienne et d'écosystèmes alimentaires, son utilisation reste un atout majeur dans ce domaine.

Données thermiques

Les données thermiques nécessaires à une appréciation des risques sont les couples temps-température, voire des profils thermiques continus. Ces données thermiques sont d'autant plus importantes que plusieurs sources de variabilité sont à prendre en compte.

Par exemple, en ce qui concerne le réfrigérateur du consommateur, il y a une variabilité spatiale (la porte et le bac à légumes sont des zones moins froides et il y a aussi généralement une différence entre le haut et le bas), une variabilité temporelle à l'échelle de la journée (due aux ouvertures de porte), une variabilité saisonnière (plus de réfrigérateurs à température élevée en été qu'en hiver) et enfin une variabilité individuelle d'un consommateur à l'autre (grande diversité entre des réfrigérateurs à température relativement élevée et d'autres à température plus basse).

Ainsi, dans l'enquête INCA [4], 7 % des températures mesurées dans des réfrigérateurs ménagers étaient inférieures à 4 °C, tandis que 18 % étaient supérieures à 10 °C, ce pourcentage de températures supérieures à 10 °C étant même de 29 % en été.

Exemples d'appréciations de risque publiées

L'un des enjeux actuels de l'appréciation des risques microbiologiques est donc de pouvoir appliquer l'ensemble des méthodes évoquées dans la partie précédente à des cas concrets, de façon aussi réaliste et exhaustive que possible.

Tableau I. Exemples d'Appréciations quantitatives de risques (AQR)

Pays/Année	Auteur/Organisme	Identification du Danger	Champs d'application	Probabilité de développer la maladie: risque individuel (RI) ou nombre de malades/an	Risque nul
Canada/1998	Cassin [5]	<i>Escherichia coli</i> O157: H7 - Hamburger	Consommation d'un hamburger au cours d'un repas	RI compris entre 10^{-25} et 10^{-1} avec un mode (valeur la plus probable) à 10^{-12}	
France/1998	Bemrah [6] / ENVA	<i>Listeria monocytogenes</i> Fromage à pâte molle au lait cru	Consommation d'une portion de 31 g Population sensible	RI compris entre de 10^{-12} à 10^{-4} avec une médiane à $1.9 \cdot 10^{-8}$	RI = 0 dans 34.7 % des scénarii
Suède/2000	Lindqvist [7] / National Food Administration	<i>Listeria monocytogenes</i> - Saumon et truite fumés ou gravlaks	Population sensible	RI $> 10^{-8}$ dans 50 % des itérations et RI $> 10^{-4}$ dans 4 % des itérations	
Danemark/2001	Christensen [8] / Veterinary and Food Administration	<i>Campylobacter jejuni</i> - Produits à base de poulet	Consommation d'un repas pris à domicile contenant du poulet. Population générale	Pour une concentration comprise entre 0.5 et 1.5 Log ufc/g: RI moyen estimé à $7.0 \cdot 10^{-5}$	
France/2002	Afssa [9]	<i>Cryptosporidium parvum</i> - Eau de distribution	70 % de la population immuno-compétente consommant l'eau de distribution	- Si n = 0.1 oocyste/litre 50 % des individus ont un risque quotidien $< 0.5 \cdot 10^{-4}$ - Si n = 1 oocyste/litre 50 % des individus ont un risque quotidien $< 4.8 \cdot 10^{-4}$	RI = 0 dans 25 % des scénarii
France/2002	Bemrah [10] / ENVA Afssa	<i>Salmonella</i> - Cordon bleu de dinde congelé	Restauration collective Cuisson en friteuse suivie ou non d'une conservation en liaison chaude. Population générale	Si n = 10 cfu/g, le risque individuel (RI) est en moyenne de: - $3.9 \cdot 10^{-3}$ (sans conservation) - $2.8 \cdot 10^{-4}$ (avec conservation)	- RI = 0 dans 75.1 % des scénarii (avec conservation) - RI = 0 dans 95.4 % des scénarii (sans conservation)
Pays-Bas/2001	RIVM [11]	<i>Escherichia coli</i> O157 H:7 - Steak tartare	Consommation de steak tartare cru aux Pays-Bas	Pour les enfants entre 1-4 ans: 86 cas/an Pour les enfants entre 5-14 ans: 168 cas/an Pour les individus de 15 ans et + : 1030 cas/an	
USA/2002	Hope [12]	<i>Salmonella</i> Enteritidis - Cœufs et produits à base d'œufs	Consommation d'œufs. Population normale et sensible	Le modèle prévoit le développement de la maladie pour: - 23 % de la population normale - 40 % de la population sensible.	

Population sensible = Personnes étant plus aptes à développer la maladie. Il peut s'agir, en fonction du danger considéré, des femmes enceintes, des nouveaux nés, des personnes âgées, des personnes immuno-dépressives, ou bien ayant des maladies chroniques.

Population normale = Personnes en bonne santé

Une présentation des résultats finaux de huit appréciations quantitatives du risque, réalisées dans différents pays et publiées de 1998 à 2002, apparaît dans le tableau I et les résultats des principales étapes de deux d'entre elles sont présentés dans les tableaux II et III.

Appréciation suédoise

Une AQR a été développée par Lindqvist et Westöö [7]. L'objectif de ce travail a été de construire un modèle d'appréciation quantitative du risque dans lequel ont été estimées l'exposition à *Listeria*

monocytogenes et la probabilité de développer une listériose lors de la consommation de saumon et de truite arc-en-ciel fumés ou gravlaks. Le nombre annuel moyen de cas de listériose prédits est de 168 avec un minimum de 47 et un maximum de 2800 et le nombre de listérioses déclarées en Suède est de 37/an.

Appréciation canadienne

Un autre exemple d'AQR a été développé par Cassin *et al.* [5] au Canada. Un modèle a été construit pour décrire l'évolution d'*Escherichia coli* O157:H7

au cours du processus de fabrication de viande hachée, en vue d'estimer l'exposition à la consommation. Il peut être mentionné que :

- une approche de microbiologie prévisionnelle a permis de modéliser la croissance entre la production et la consommation,

- l'estimation de l'exposition est utilisée comme paramètre d'entrée dans un modèle dose-réponse pour estimer, en fonction de la distribution de la consommation, le risque de maladie.

Une méthode d'analyse de sensibilité a été mise en œuvre en vue de quantifier l'impact de la variabilité des paramètres d'entrée sur la variabilité du risque de développer la maladie et les coefficients de corrélation de rang sont placés sur un diagramme appelé diagramme de Spearman. L'importance de certains facteurs est ainsi mise en évidence et il est possible d'élaborer des stratégies permettant de réduire le risque. Trois stratégies sont simulées et leur efficacité sur le risque est évaluée. Selon les estimations, des modifications appropriées de la température de conservation de la viande hachée au cours de la vente conduirait à une diminution importante du risque.

Construction d'une appréciation de l'exposition

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) conduit actuellement un projet de recherche, rassemblant une vingtaine de scientifiques issus de l'agence, ainsi que d'autres organismes de recherche (Ecole Vétérinaire de Lyon, Cemagref...). Ce projet porte sur la construction d'une démarche d'appréciation de l'exposition à *Listeria monocytogenes*, micro-organisme responsable d'une infection grave, la listériose, touchant principalement des sujets dont le système immunitaire est fragilisé. Plus particulièrement, l'objectif de ce projet est d'estimer l'exposition à *Listeria monocytogenes* liée à la consommation de trois produits réfrigérés : saumon fumé, Munster au lait pasteurisé et rillettes.

Schéma général du modèle d'appréciation

Schématiquement, la figure 5 représente le modèle de cette appréciation de l'exposition. Ce modèle est décomposé en trois sous-modèles : le modèle de croissance microbienne, le modèle thermique et le modèle de consommation.

Une variable essentielle du modèle d'appréciation de l'exposition est la prévalence. En effet, si le produit n'est pas contaminé à la sortie usine, alors l'exposition est nulle, puisque nous excluons l'hypothèse d'une recontamination (les produits étudiés sont conditionnés, il ne

Tableau II. Appréciation quantitative du risque de listériose par consommation de saumon et de truite arc-en-ciel fumés ou gravlaks en Suède [7]

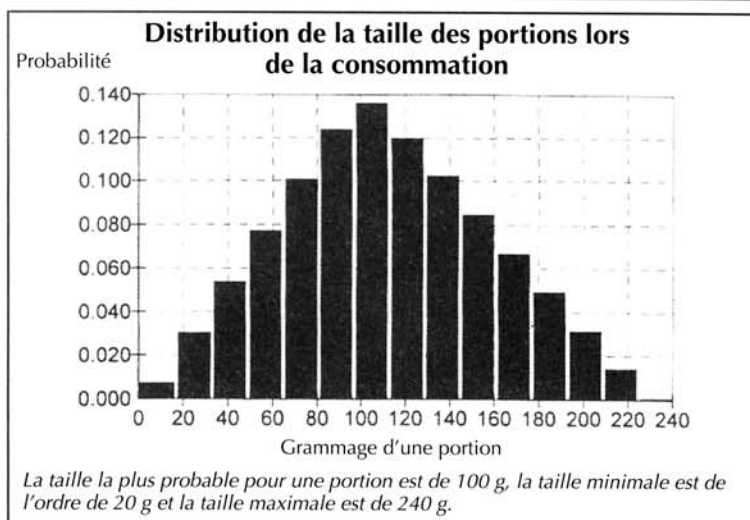
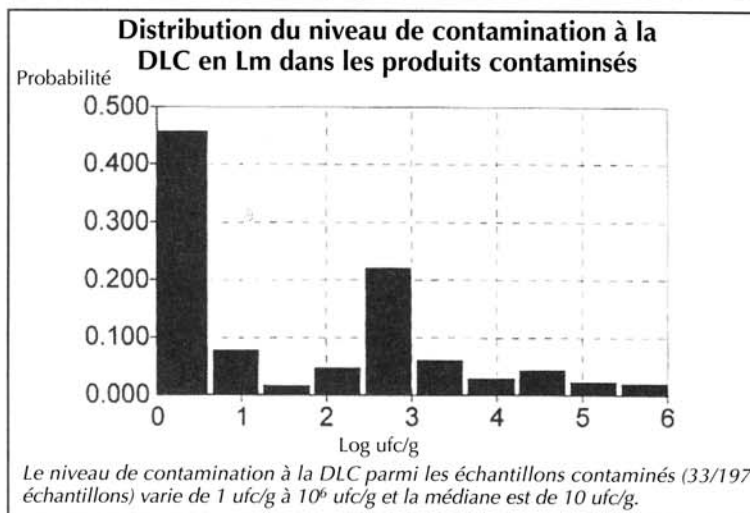
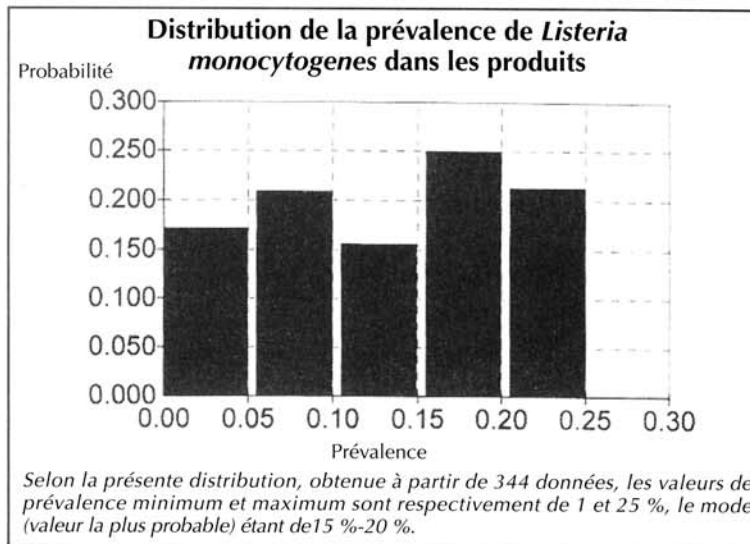
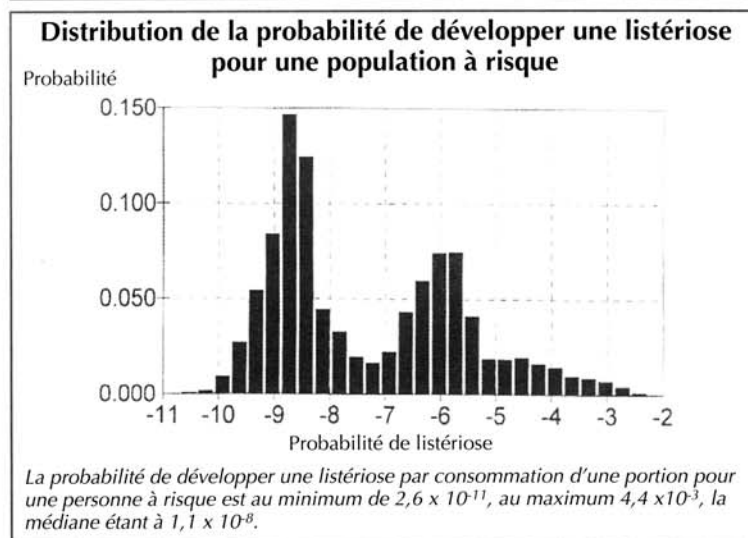
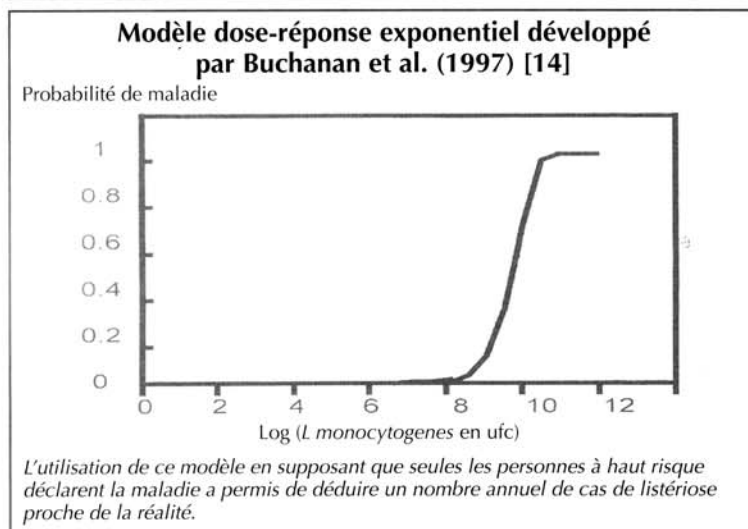
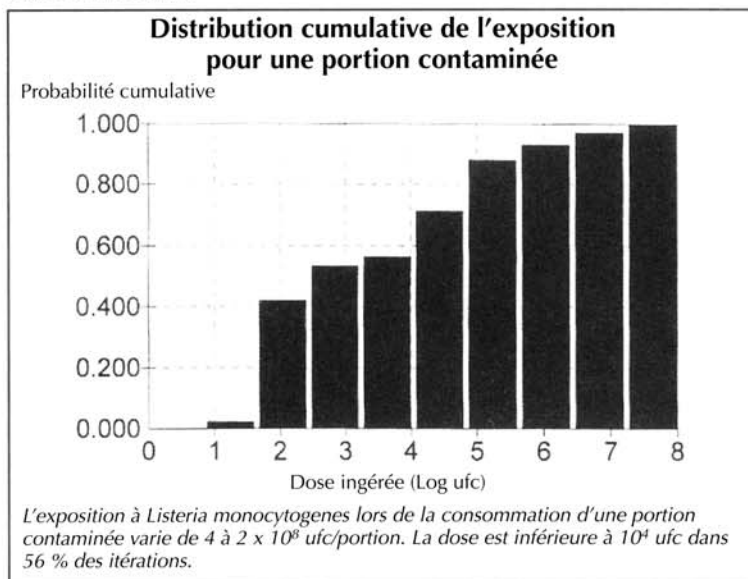


Tableau II. Suite



peut donc pas y avoir de recontamination pendant le transport, le stockage et la distribution). En revanche, si le produit est contaminé, alors *Listeria monocytogenes* peut se développer entre la sortie usine et la consommation, ce qui justifie l'introduction du modèle de croissance dans le modèle d'appréciation de l'exposition. Le modèle de croissance est donc fonction du modèle thermique, de la physico-chimie du produit et du dénombrement initial.

Nous excluons l'hypothèse d'une inactivation thermique entre la sortie usine et la consommation, puisque les produits considérés (saumon fumé, munster au lait pasteurisé, rillettes) sont rarement cuits avant consommation.

Enfin, la portion consommée, résultat du modèle de consommation, multipliée par le nombre de *Listeria monocytogenes* à la consommation, permet d'estimer l'exposition.

Origine des données expérimentales

Plus qu'une étude supplémentaire relative à l'appréciation de l'exposition, ce projet est novateur, puisque toutes les variables sont estimées à partir de données recueillies explicitement. Les appréciations quantitatives du risque sont habituellement réalisées à partir de données de la littérature (comme dans les exemples précédemment exposés). Or ce type de données a été recueilli dans un autre contexte, et avec un plan d'échantillonnage non dédié à l'AQR. Par exemple, une enquête antérieure a pu étudier la prévalence dans une usine particulière; il est dommageable d'introduire cette prévalence recueillie dans le passé et ne prenant pas en compte la variabilité inter-usine dans l'AQR.

Modélisation de l'appréciation de l'exposition

Les variables des modèles de croissance microbienne, thermique et de consommation sont caractérisées par de l'incertitude (erreur de mesure, incertitude d'échantillonnage) et de la variabilité (hétérogénéité naturelle de la population).

Prévalence

La variabilité sur la prévalence peut avoir des origines différentes. D'une part, elle peut être inter-usine. En effet, les niveaux

d'hygiène peuvent être différents entre les usines, au moins ponctuellement. D'autre part, elle peut aussi être temporelle puisque la contamination des produits est susceptible d'évoluer en fonction du temps. Elle peut aussi être saisonnière. La prévalence observée est également incertaine, puisque le nombre d'échantillons analysés est faible par rapport à la taille de la population. De plus, les résultats de recherche de *Listeria monocytogenes* sur les échantillons sont incertains : la bactérie peut être présente dans le produit bien que les analyses microbiologiques ne permettent pas de la détecter. L'incertitude peut donc être d'échantillonnage ou microbiologique.

Modèle de croissance

Les incertitudes et les variabilités sur le dénombrement initial, la physico-chimie et sur les profils temps-température se propagent dans le modèle de croissance. De plus, d'autres variabilités peuvent être prises en compte sur le modèle de croissance, par exemple la variabilité liée à l'appétit de croissance.

Le niveau de contamination initiale est variable mais aussi incertain. L'incertitude a alors deux composantes, puisqu'elle peut être d'échantillonnage mais aussi analytique (erreur de mesure sur le dénombrement initial). Les caractéristiques physico-chimiques des plaques de saumon

fumé sont variables entre les usines mais aussi à l'intérieur d'une usine. De plus il existe une incertitude d'échantillonnage puisque les produits analysés ne représentent pas toute la gamme des possibilités.

La variabilité et l'incertitude sur les couples temps-température sont également traitées dans le modèle thermique. Les températures de conservation varient.

De plus, la durée de conservation peut être variable puisque la durée de vie du saumon fumé est généralement de trois semaines (date limite de consommation). L'incertitude sur le modèle thermique est prise en compte, de même que l'incertitude d'échantillonnage liée au nombre réduit de profils temps-température recueillis.

Modèle de consommation

La portion consommée est variable entre les consommateurs. Le nombre de consommateurs dans le panel étant limité, les données de consommations disponibles sont alors marquées par l'incertitude d'échantillonnage.

Méthodes statistiques pour traiter l'incertitude et la variabilité

La variabilité peut être modélisée par ajustement de lois statistiques sur les

données disponibles. L'incertitude peut être traitée dans un cadre fréquentiste ou bayésien. Le bootstrap, méthodologie fréquentiste introduite par Efron [15] est une solution pour quantifier l'incertitude. L'approche bayésienne suppose la spécification d'une distribution a priori qui, combinée aux données observées, fournit une distribution a posteriori.

Il faut ensuite propager les incertitudes et les variabilités précédentes sur le résultat final, c'est-à-dire l'appréciation de l'exposition.

L'incertitude et la variabilité étant deux concepts différents, il est logique de les distinguer et de les séparer dans les simulations [16]. Les simulations sont alors à deux dimensions, l'une pour l'incertitude et l'autre pour la variabilité.

Par conséquent, l'exposition est également incertaine et variable.

Objectif scientifique

L'objectif de l'appréciation quantitative du risque est de fournir une estimation de la probabilité d'apparition d'une maladie en utilisant une approche scientifique. C'est un outil utilisé dans le domaine de collaborations internationales et dans le cadre d'échanges internationaux.

L'AQR repose sur l'acquisition de données (prévalence, niveau de contamination, grammage des portions, profils thermiques), sur l'association de distributions à chaque donnée et sur la construction de modèles : modèles thermiques, modèles de croissance bactérienne, modèle d'exposition.

Dans ce contexte, la qualité de l'AQR dépend en grande partie de la qualité du travail d'enquête relatif aux données : l'obtention de résultats propres, s'ils sont en nombre suffisant, est préférable à l'utilisation de résultats obtenus à partir d'autres études.

Il est important de souligner l'intérêt de l'approche de certains auteurs qui prennent en compte les facteurs susceptibles d'influencer le risque et élaborent des stratégies permettant la réduction du risque. ■

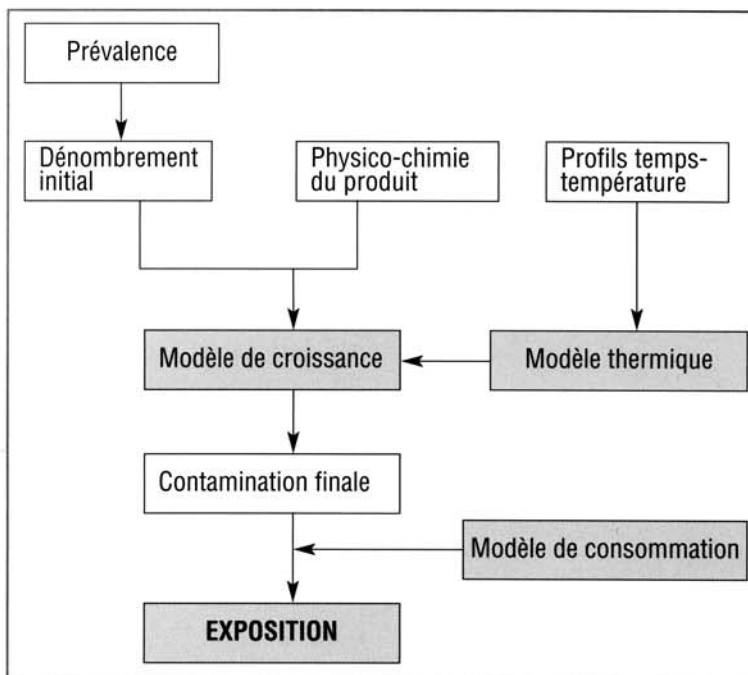
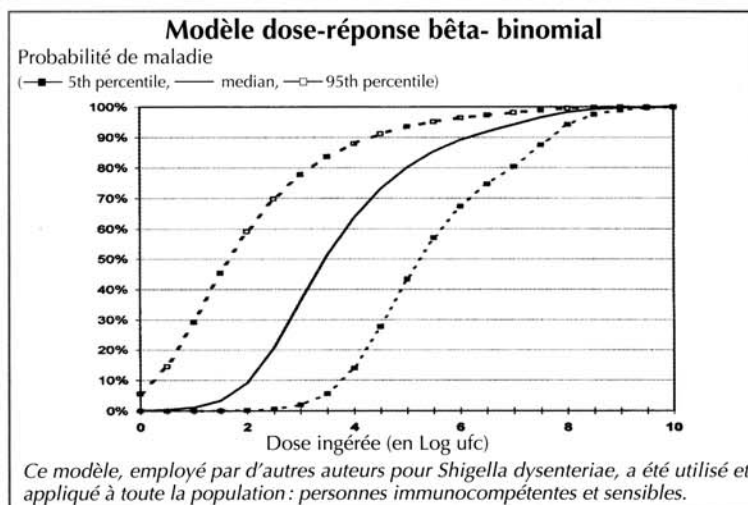
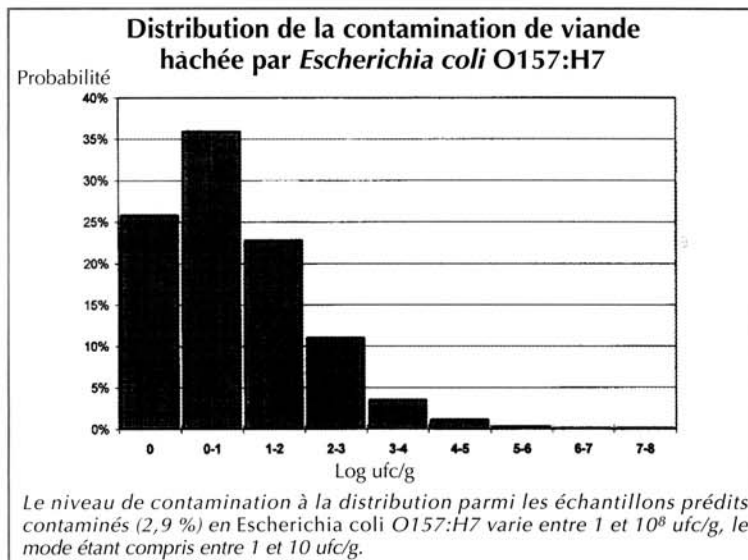
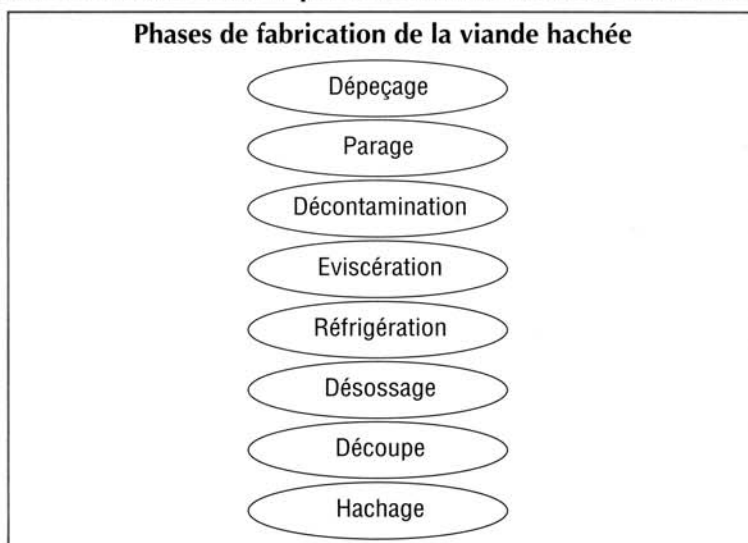


Figure 5. Représentation schématique du projet de recherche sur *L. monocytogenes* dans les produits réfrigérés

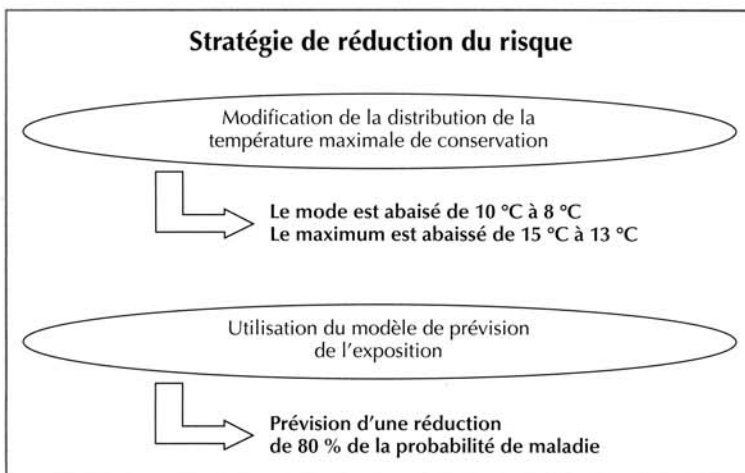
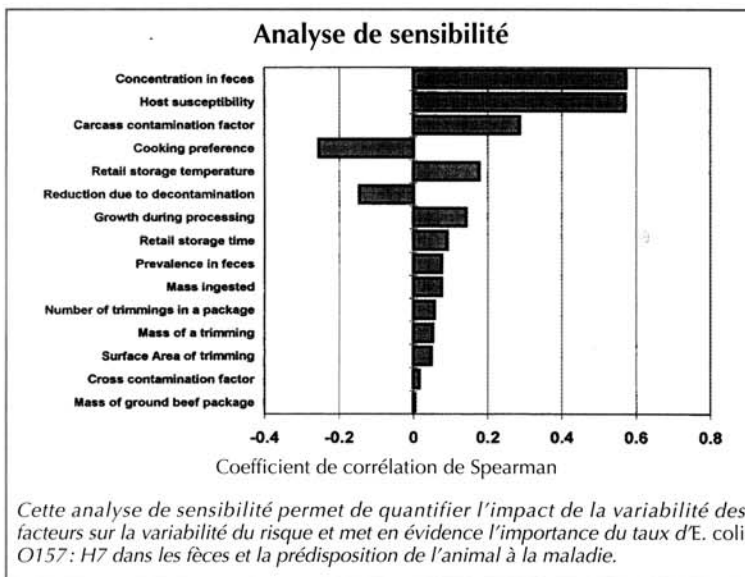
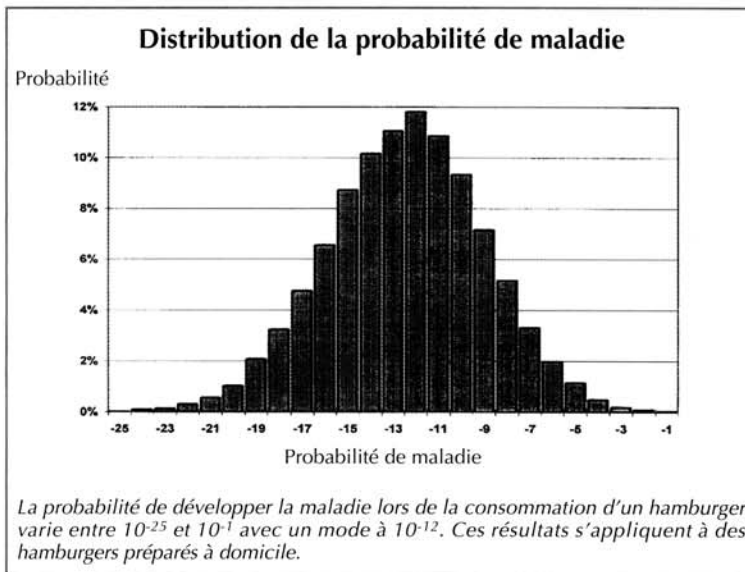
Tableau III. Appréciation quantitative du risque de maladie due à *Escherichia coli* O157:H7 par consommation de viande hachée [5]



Bibliographie

1. Haas C.N., Rose J.B., Gerba C.P., 1999. Quantitative microbial risk assessment, John Wiley & Sons. New York, USA.
2. Lammerding A.M., Fazil A., 2000. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 58:147-57.
3. Vose D.J., 2000. Risk Analysis - A Quantitative Guide. 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England.
4. Credoc, Afssa, ministère de l'Agriculture et de la Pêche – "Enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires". Tec Doc Lavoisier, 2000.
5. Cassin M.H., Lammerding A.M., Todd E.C.D., Ross W., Stephen McColl R., 1998. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 21-44.
6. Bemrah N., Sanaa M., Cassin M.H., Griffiths M.W., Cerf O., 1998. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine*, 1311, 1-17.
7. Lindqvist R., Westöö A., 2000. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravid salmon and rainbow trout in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 181-196.
8. Danish Veterinary and Food Administration, 2001. Risk Assessment on *Campylobacter jejuni* in chicken products. 1^{ère} Edition, Janvier 2001.
9. Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments), 2002. Rapport sur les infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau :

Tableau III. Suite



évaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium* - septembre 2002.

10. B.K. Hope, A.R. Baker, E.D. Edel, A.T. Hogue, W.D. Schlosser, R. Whiting, R.M. McDowell, and R.A. Morales, 2002. An overview of the *Salmonella enteritidis* Risk Assessment for Shell Eggs and Egg Product. *Risk Analysis*, vol. 22 (2), 203-218.

11. Bemrah N., Bergis H., Colmin C., Beaufort A., Milleman Y., Dufour B., Benet J.J., Cerf O., Sanaa M., 2002. Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 17-30.

12. RIVM (National Institute of Public Health and the Environment), 2001. Risk Assessment of Shiga – toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands – Octobre 2001.

13. Hope B.K., Baker A.R., Edel E.D., Hogue A.T., Schlosser W.D., Whiting R., McDowell R.M., and R.A. Morales, 2002. An overview of the *Salmonella enteritidis* Risk Assessment for Shell Eggs and Egg Product. *Risk Analysis*, vol. 22 (2), 203-218.

14. Buchanan R.L., Damert. W.G., Whiting R.C., Van Schothorst M., 1997. Use of Epidemiologic and Food Survey Data To Estimate a purposefully Conservative Dose-Response Relationship for *Listeria monocytogenes* Levels and Incidence of Listeriosis. *Journal of Food Protection*, 60, 918-922.

15. Efron B., Tibshirani R.J., 1993. An introduction to the Bootstrap, Chapman & Hall.

16. Cullen A.C., Frey H.C., 1999. Probabilistic Techniques in Exposure Assessment, Plenum.

Methodological Developments in Exposure Assessment of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Salmon

Marie Cornu and Annie Beaufort
Afssa (French agency for food safety)
LERQAP
23 Avenue du Général de Gaulle
F 94706 Maisons Alfort Cedex.
France

and the steering committee of the project:
A.L. Afchain (Cemagref), H Bergis
(Afssa), A. Brisabois (Afssa),
M.L. Delignette-Muller (veterinary school
of Lyon), N. Gnanou-Besse (Afssa),
P. Fravalo (Afssa), L. Laloux (Afssa),
P. Malle (Afssa), R. Pouillot (Afssa,
Centre Pasteur of Cameroon)

Keywords: predictive microbiology, cold chain, quantitative risk assessment, uncertainty, variability, second-order Monte Carlo simulations.

Abstract

This paper summarizes a four-year quantitative microbial risk assessment project. This project enabled: (i) to build a multidisciplinary collaborative approach, (ii) to generate a dedicated data collection concerning *L. monocytogenes* and French cold-smoked salmon, (iii) to propose various methodological developments, (iv) and to assess the exposure to *L. monocytogenes* of French cold-smoked salmon consumers.

INTRODUCTION

Development of microbial exposure assessment is recent and generally suffers of a lack of information, quantitative data and adequate modelling methods. The French Agency for Food Safety (Afssa) led a research project (Beaufort et al., 2002) between 2001 and 2004, which involved 9 scientific teams from different research institutions. The objective was to build methods for a federated, interdisciplinary and integrated approach of microbial exposure assessment. This project was applied to the case-study of *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon and the pathway was studied from end of production to consumption.

Numerous recent risk assessments have concerned *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon (Buchanan, 1997; Lindqvist and Westöö, 2000; FSANZ, 2002; FDA, 2003; FAO/WHO, 2004). This abundance is clearly justified by the sanitary and economic importance of this issue, but it may also be explained by the relatively good availability of data. However, most of these risk assessment reports still identify methodological gaps and/or data gaps. The present Afssa project particularly aimed to focus on these research needs, and more specifically to better characterize the contamination data, to integrate the modelling of the cold chain, to improve and validate the tools of predictive microbiology relative to growth of *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon, and to take into account uncertainty and variability on each input of the exposure model.

The aim of this paper is to summarize our four-year research project and to review the publications prepared in this framework.

MODELLING CONTAMINATION INPUTS

Prevalence of *L. monocytogenes* in Cold-smoked Salmon

L. monocytogenes was detected in 104 products among 1010 analysed packs, from 9 different French producers (Beaufort et al., 2004; Beaufort et al., submitted).

The between-producer variability and the sampling uncertainty were considered through adequate statistical methods (Miconnet et al., in press). Significant differences were indeed observed between these producers: percentages of contaminated packs per producer ranged from 0% (95% confidence interval: [0%-3%]) to 41% (95IC: [30%-

51%]). These 95% confidence intervals are a simplified way to express the sampling uncertainty. In the simulations, the sampling uncertainty on the prevalence of each producer was modelled through Bayesian credibility distributions, using the Jeffrey's non-informative prior: Beta (0.5, 0.5) (Miconnet et al., in press; in-preparation paper).

Concentration of *L. monocytogenes* in Cold-smoked Salmon after Production

A method was developed for enumeration of low concentrations of *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon (Gnanou Besse et al., 2004). This method was applied to quantify concentration of *L. monocytogenes* in 63 naturally contaminated products, i.e. in which *L. monocytogenes* had been detected through the detection procedure, within 7 days after the end of production (Beaufort et al., 2004; Beaufort et al., submitted). For most of these samples (68%), this initial level was below the enumeration threshold, 0.2 cfu/g. The highest initial level collected was 7 cfu/g.

This enumeration was applied on the products of three different producers. A between-producer variability was observed but could not be taken into account. Thus, a log-normal variability distribution was fitted to the observed initial levels of the 63 enumerated packs, the observations below the enumeration threshold were considered as censored data, whereas sampling uncertainty was taken into account, using bootstrap resampling (in-preparation paper).

All the *L. monocytogenes* isolates from smoked salmon were characterized for their serotypes, and PFGE-types (Kerouanton et al., 2003). Last, the background microflora was quantified.

MODELLING GROWTH ALONG THE COLD-CHAIN

Lag Time, Strain History and Stress

Cold stresses encountered by *L. monocytogenes* during the production process were described and reproduced experimentally to evaluate their impact on growth of *L. monocytogenes* (Bergis, 2001). Our objective was to use this characterization of strain histories to predict the lag time, but this issue still requires more investigation (Delignette-Muller et al., in press). To date, a null lag time at our initial level (end of production) was assumed, as a fail-safe hypothesis.

Growth Rate and Physico-chemical Characterization of Smoked Salmon

Quantitative data concerning pH, and moisture, fat, salt, and phenol contents of 40 products, from 8 different French producers, were acquired and used to investigate the potential of using secondary models based on these physicochemical factors (Cornu et al., 2003, Cornu et al., submitted).

Growth Rate and Secondary Model

Growth of *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon was modelled on the basis of challenge tests (kinetics of *L. monocytogenes* in/on spiked, i.e. artificially contaminated, cold-smoked salmon). The methodology of challenge tests was discussed in Miconnet et al. (in revision).

In the framework of this project, 61 challenge tests of 6 different strains of *L. monocytogenes* in/on 7 different batches of cold-smoked salmon at different chilled temperatures were performed (Bergis et al., 2004; Cornu et al., 2003; Cornu et al., submitted). In addition, 35 literature challenge tests were also considered.

A Bayesian procedure, similar to that proposed by Pouillot et al. (2003), was used to obtain second-order distributions of *L. monocytogenes* growth parameters, T_{\min} and $\mu_{5^{\circ}\text{C}}$ (in-preparation paper).

Maximum Population Density and Competition

Growth of the naturally occurring background flora was also considered to model the Jameson effect, i.e. the competition between *L. monocytogenes* and the background flora (see Cornu, 2001).

For this reason, a Bayesian procedure, similar to that used to model *L. monocytogenes*, was used to obtain second-order distributions of the growth parameters, including the maximum population density (in-preparation paper).

Characterisation of the Cold-chain of Smoked Salmon

The temperature of cold-smoked salmon packs was monitored at each step of the cold-chain. Data were modelled to be integrated in the predictive microbiology and exposure assessment models (Afchain et al., 2005, poster in this congress).

Storage Trials and Validation of the Growth Model

As the model was based on challenge tests, storage trials (kinetics of *L. monocytogenes* in/on naturally contaminated cold-smoked salmon) were performed to validate the model. Thus, 63 naturally-contaminated cold-smoked salmon packs were enumerated first at the beginning of the shelf-life and later on a remaining portion kept first at 4°C for 7 to 15 days and then at 8°C for 7 days. For this late examination, 77% of the positive samples harboured less than 10 cfu/g, 5% yielded between 10 and 100 cfu/g, 18% more than 100 cfu/g. The highest level detected was 2.800 cfu/g (Beaufort et al., 2004; Beaufort et al., submitted).

Predictions based on standard modelling hypotheses were far too fail-safe, as the predicted final *L. monocytogenes* levels were far superior to the observed final levels (Beaufort et al., submitted). On the contrary, the predictions of the model developed in this project, which included the Jameson effect, were much closer to the observations (in-preparation paper).

MODELLING EXPOSURE OUTPUTS

Consumption Data

National consumption databases were used to evaluate the consumption frequency of cold-smoked salmon and the consumed quantities per serving (in-preparation paper).

Exposure Assessment and Second-order Monte Carlo Simulations

For each input of the model, double distributions, based on field characterization of uncertainty and variability, were built through various methods (classical statistical inference, Bayesian inference, bootstrap resampling) and integrated in second-order Monte Carlo simulations (see e.g. Miconnet et al., 2003). Then, double distributions are obtained for each output of the model: levels of *L. monocytogenes* at the time of consumption in contaminated cold-smoked salmon, exposure to *L. monocytogenes* per serving of contaminated cold-smoked salmon, exposure to *L. monocytogenes* per serving of cold-smoked salmon, exposure to *L. monocytogenes* due to cold-smoked salmon per year (in-preparation paper). Additional outputs, as the annual risk of listeriosis due to cold-smoked salmon can be considered, if a dose-response model is taken into account (see next section).

The impact of uncertainty and variability and the potential use of risk mitigation strategies are discussed through sensitivity analyses and what-if scenarii.

TOWARDS MODELLING RISK

Virulence of *L. monocytogenes* and Cold-smoked Salmon

The impact of the cold-smoked salmon on the expression of virulence by *L. monocytogenes* was studied (Midelet-Bourdin et al., submitted). Beyond the exposure

assessment *sensu stricto*, this provides some information about the hazard characterization.

Dose-response Modelling

As this project mainly focused on exposure, modelling dose-response was not included in the aims of the data collection. However, recently published dose-response models (FDA, 2003; FAO/WHO, 2004) can be used, in combination with our exposure results to assess the risk of listeriosis due to cold-smoked salmon (in-preparation paper).

CONCLUSION

This project enabled:

- to build a multidisciplinary collaborative approach, as this project raised extensive exchanges between statisticians, food microbiologists, process engineers, physiologists... and stakeholders,
- to generate a dedicated data collection concerning *L. monocytogenes* and French cold-smoked salmon, including:
 - microbiological analyses to assess prevalence and contamination levels,
 - molecular typing of strains,
 - growth kinetics in broth, challenge tests, and storage trials,
 - monitoring of time-temperature profiles during production, intermediary storage and transport, retail, domestic storage, and consumption
 - study of virulence influenced by the food matrix,
- to propose various methodological developments, including the development:
 - of a new sensitive enumeration method of *L. monocytogenes*,
 - of a more realistic growth model to predict the growth kinetics of *L. monocytogenes*,
 - of an integrated time-temperature modelling approach,
 - of second-order Monte Carlo simulations based on different approaches (classical statistical inference, Bayesian inference, bootstrap resampling) to quantify separately uncertainty and variability,
- and to assess the exposure to *L. monocytogenes* of French cold-smoked salmon consumers, based on an exhaustive modelling of the pathway, to evaluate the main associated uncertainty and variability sources, to study the most influential inputs and/or hypotheses, and then to focus future research efforts to decrease uncertainties, and to identify leverage factors for mitigation strategies.

Literature Cited

with an asterisk: prepared within the present Afssa project

- *Afchain, A.L., Cornu, M., Derens, E. and Guilpart, J. 2005. Statistical modelling of cold-smoked salmon thermal profiles for risk assessment of *Listeria monocytogenes*. Model-IT. Leuven, Belgium, 29 May-2 June 2005. Poster.
- *Beaufort, A., Bergis, H., Brisabois, A., Cornu, M., Delignette, M.L., Gnanou-Besse, N., Laloux, L., Malle, P., Morelli, E., Pouillot, R. and Salvat, G. 2002. On-going project: towards an interdisciplinary description of the factors affecting exposure to *Listeria monocytogenes* in chilled products. COST 920, Bilthoven, Netherlands, 7-8 March 2002.
- *Beaufort, A., Rudelle, S., Gnanou-Besse, N., Toquin, M.T., Bergis, H., Salvat, G. and Cornu, M. 2004. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. ISOPOL, Uppsala, Sweden, 12-15 september 2004.
- *Beaufort, A., Rudelle, S., Gnanou-Besse, N., Toquin, M.T., Kerouanton, A., Bergis, H., Salvat, G. and Cornu, M. Submitted. Prevalence, characterization and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold smoked salmon. Int. J. Food Microbiol. Submitted full paper.
- *Bergis, H. 2002. Technologie de préparation du saumon fumé : incidence du froid sur le développement microbien. Revue Générale du Froid. 1028:30-34.

- *Bergis, H., Beaufort, A., Cornu, M. and Rudelle, S. 2004. Variability of growth of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cold-smoked salmon. ASEPT, Laval, France, 17-18 March 2004.
- Buchanan, R.L. 1997. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. J. Food Prot. 0, 918-922.
- Cornu, M. 2001. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and food flora *in situ*. MODEL-IT, Massey, New Zealand, 9-13 December 2001.
- *Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Laloux, L., Bergis, H., Miconnet, N., Serot, T. and Delignette-Muller M.L. 2003. Growth of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. Comparison and validation of predictive models. PMF4, Quimper, France, 15-19 June 2003.
- *Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Laloux, L., Bergis, H., Miconnet N., Serot, T. and Delignette-Muller, M.L. Submitted. Growth rates of *Listeria monocytogenes* on surface of cold-smoked salmon: the effects of temperature, a_w (NaCl) and phenolic content. Submitted full paper.
- *Delignette-Muller, M.L., Baty, F., Cornu, M. and Bergis, H. In press. The effect of the temperature shift on the lag phase of *L. monocytogenes*. Int J Food Microbiol. In press.
- FAO-WHO. 2004. Risk Assessment of *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. Microbiological Risk Assessment Series 5. FAO/WHO 2004 (ISBN 92-5-105127-5)
- FDA. 2003. Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>
- FSANZ. 2002. Final assessment. Report proposal P239. *L. monocytogenes* risk assessment, risk management strategy: <http://www.anzfa.gov.au/standardsdevelopment/proposals>
- *Gnanou Besse, N., Audinet, N., Beaufort, A., Colin, P., Cornu, M. and Lombard, B. 2004. A contribution to the improvement of *Listeria monocytogenes* enumeration method in smoked salmon. Int J Food Microbiol. 91:119-127.
- *Kerouanton-Le Gall, A., Marault, M., Beaufort, A., Cornu, M., Rudelle, S. and Brisabois, A. 2003. Détection et caractérisation moléculaire de souches de *Listeria monocytogenes* isolées de saumon fumé en France. SFM, Paris, France, 13-14 November 2003.
- Lindqvist, R. and Westö, A. 2000. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. Int. J. Food Microbiol. 58:181-96.
- *Miconnet, N., Delignette-Muller, M.L., Rosso, L. and Cornu, M. 2003. Growth rate uncertainty and variability in quantitative risk assessment. PMF4, Quimper, France, 15-19 June 2003.
- *Miconnet, N., Cornu, M., Beaufort, A., Rosso, L. and Denis, J.B. In press. Uncertainty distribution associated with estimating a proportion in microbial risk assessment. Risk Anal. In press.
- *Miconnet, N., Geeraerd, A., Van Impe, J., Rosso, L. and Cornu M. In revision. Reflections on the use of robust and least-squares non-linear regression to model challenge tests conducted in/or food products. Int J Food Microbiol.
- *Midelet-Bourdin, G, Leleu G, Copin, S, Roche, S.M., Velge, P. and Malle P. Submitted. Effect of food matrix (potted minced pork, pasteurised milk, raw and cold-smoked salmon) on the virulence expression of *Listeria monocytogenes in vitro*. J. Food Prot. Submitted full paper.
- Pouillot, R., Albert, I., Cornu, M. and Denis, J.B. 2003. Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol 81, 87-104.

Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon

A. Beaufort^{1*}, S. Ruellet¹, N. Grassein-Benoit¹, M.T. Tognin², A. Roussillon¹, H. Bergin¹, C. Saliot¹, M. Corne¹

¹ French Food Safety Agency (ANSES), UR1241, BP 17, 14 rue des Cordeliers, 75004 Paris, France

² French Food Safety Agency (ANSES), UR1241, BP 17, 14 rue des Cordeliers, 75004 Paris, France

Running headline: *L. monocytogenes* in smoked salmon

Abstract

Aims: To investigate *L. monocytogenes* contamination and behaviour in naturally contaminated French cold-smoked salmon (CS).

Method and results: Between 2009 and 2010, *L. monocytogenes* was detected in 104 of 1000 CS packs, produced by nine French plants, with different prevalences (from 0% to 4%). The initial contamination, measured with a sensitive filtration method, was low (30% of contaminated products below 1 cfu/g) and growth was limited.

Conclusion: Growth was consistent with results of a predictive model including microbial competition.

Significance and impact of study: To be included in a quantitative risk assessment.

Keywords: Cold-smoked salmon, *Listeria monocytogenes*, Prevalence, Contamination levels, Growth.

INTRODUCTION

L. monocytogenes is specifically adapted to cold temperatures and is usually consumed without further cooking (1). In France, some 15,000 tonnes of salmon are produced annually, drying, cold-smoking, brining and smoking being the main processes. Brining is also used. Storage is at 0–4 °C. Physicochemical characteristics (measured for 40 French retail products) are: water content, 2.6 g/100 g; NaCl content, 1.4–4.1 g/100 g; pH, 5.5–6.5; phenolic concentration, 0.0–0.1 mg/100 g; and peroxide value, 0.0–0.5 mg/100 g (2). These physicochemical characteristics cannot prevent growth of *L. monocytogenes* and significant growth is observed at chilled temperatures in challenge tests (3,4) whereas results are less pronounced in storage trials, with a natural contamination (5,6; Lappi et al. 2004).

The purpose of the present study was to investigate the prevalence, contamination levels and behaviour of *L. monocytogenes* in vacuum-packed, sliced CS produced in France, as part of a quantitative risk assessment (QRA) (Pouillot et al. submitted).

MATERIAL AND METHOD

Prevalence study

• Sampling and storage

Eight CS processing plants (labelled 1 to 8) were selected, using stratified random sampling, with two sampled plants per strata, based on the number of tons produced per year. From February to June 2009, 300 samples were randomly sampled by the manufacturers: 10 samples were collected from each of these six first processing plants once a month, just after packaging, and sent to the laboratory under a cold regime.

From September to December 2009, and then from March to April 2010, 300 samples, produced in the eight selected plants, were purchased in their early shelf life in retail stores and brought back to the laboratory under refrigeration.

*Corresponding author: Tel: +33 (0) 1 42 92 42 42; Fax: +33 (0) 1 42 92 42 42; E-mail: a.beaufort@anses.fr

La version publiée de l'article
sera consultable sur
www.blackwell-synergy.com

The definitive version
will be available at
www.blackwell-synergy.com

Distribution d'incertitude d'une proportion

Nicolas Miconnet* — Marie Cornu* — Jean-Baptiste Denis** —
Laurent Rosso*

* Afssa - 22, rue Pierre Curie - BP 332- 94709 Maisons-Alfort Cedex (France)
n.miconnet@afssa.fr

** Inra - Unité de Recherche BIA - 78352 Jouy-en-Josas (France)

RÉSUMÉ. L'incertitude sur une proportion d'aliments contaminés est essentielle en estimation des risques microbiologiques. Dans cet article, nous évaluons différentes méthodes pour obtenir une distribution d'incertitude sur une proportion.

ABSTRACT. Uncertainty on proportion of contaminated food products is essential in microbial risk assessment. Different methods were compared to build uncertainty distributions for a proportion.

MOTS-CLÉS : Incertitude, proportion, distribution

KEYWORDS: Uncertainty, proportion, distribution

1. Introduction

L'estimation des risques sanitaires associés à des aliments contaminés par des micro-organismes pathogènes demande la prise en compte de la proportion de produits contaminés. Cette proportion théorique inconnue (notée p par la suite) est en pratique estimée sur la base d'analyses d'un nombre limité de produits (souvent une trentaine [LIN 00]), tirés indépendamment. En admettant que p est constant, on utilisera donc le modèle binomial. L'estimation de cette proportion est donc entachée d'une incertitude d'échantillonnage importante, qu'il est usuel dans ce domaine de représenter à l'aide d'une distribution. Ces dernières sont ensuite utilisées dans des simulations de type Monte-Carlo. Différentes méthodes sont alors possibles pour obtenir une distribution d'incertitude sur cette proportion. Vose [VOS 00] propose trois approches bayésiennes. Mais une approche fréquentiste reposant sur les distributions de confiance ([SCH 02]) peut aussi être utilisée. Dans cet article, nous proposons deux critères quantitatifs pour évaluer ces différentes approches pour des valeurs de p fixées.

2. Présentation des différentes méthodes

2.1. Approche bayésienne

Elle suppose la spécification d'une distribution *a priori* qui, combinée aux données observées, fournit une distribution *a posteriori*. Une spécification *a priori* basée sur une loi Beta (notée β) permet pour un modèle binomial d'obtenir une distribution *a posteriori* Beta. La loi Beta, définie sur $[0, 1]$ est la distribution classique pour modéliser une proportion. Si $\beta(a, b)$ est la distribution *a priori*, alors la distribution *a posteriori* est $\beta(i + a, n - i + b)$ où i (respectivement n) est le nombre de succès dans le modèle binomial (respectivement la dimension de l'échantillon). On utilise généralement des *a priori* non informatif traduisant un manque de connaissance avant l'analyse des données, toutefois non informatif ne signifie pas sans influence sur la distribution *a posteriori*. Trois *a priori* sont généralement proposés en estimation des risques pour analyser une proportion [VOS 00] :

- *a priori* $\beta(1, 1) \Leftrightarrow U_{[0,1]}$: cet *a priori* non informatif maximisant le principe d'entropie est généralement retenu en microbiologie alimentaire.

- *a priori* $\beta(\frac{1}{2}, \frac{1}{2})$: c'est l'*a priori* correspondant à la mesure de Jeffrey dans le cas d'un modèle binomial.

- *a priori* $\beta(0, 0)$: bien que non défini mathématiquement, cet *a priori* a été proposé par Haldane pour estimer une incertitude sur une proportion observée. Il permet d'obtenir une estimation de la moyenne non biaisée.

2.2. Approche fréquentiste

Un équivalent fréquentiste aux distributions *a posteriori* bayésiennes existe pour obtenir une distribution d'incertitude sur une proportion. Cette approche est basée sur les distributions de confiance [SCH 02]. Une distribution de confiance sur le paramètre d'intérêt est calculée à partir des données pour le modèle statistique spécifié (dans notre cas le modèle binomial). La distribution de confiance cumulative notée F évaluée en p_0 correspond à la p-value du test unilatéral de l'hypothèse $H_0 \leq p_0$ (se reporter à [SCH 02] pour plus de développement). Pour un modèle discret, cas du modèle binomial, une correction de continuité est nécessaire et l'on a :

$$F_x(\theta) = P_\theta(X > x) + \frac{1}{2}P_\theta(X = x) \quad [1]$$

où X suit une Binomiale $B(n, \theta)$ et avec θ le paramètre d'intérêt et x la réalisation de la variable aléatoire X .

3. Comparaison des différentes méthodes

L'objectif est de comparer ces quatre méthodes pour des valeurs de p variant de 0 à 1 (bornes exclues), avec n fixé à 30. Chacune s'exprimant par une distribution sur

[0,1] en fonction du nombre de positifs observés, nous avons défini puis utilisé deux critères mesurant la proximité d'une distribution à une valeur de p : nos critères sont donc des fonctions de p .

3.1. Critères et méthode d'évaluation

Le premier critère proposé C_1 est l'espérance de l'erreur quadratique moyenne de la distribution d'incertitude :

$$C_1(p) = \sum_{i=0}^n p_i(p) [Var(\pi_i) + (E(\pi_i) - p)^2] \quad [2]$$

avec p la probabilité théorique, π_i la distribution d'incertitude calculée sur un échantillon de taille n avec i succès et $p_i = C_n^i p^i (1-p)^{(n-i)}$ où p_i est la probabilité d'avoir i produits contaminés sur les n analysés.

C_1 prend en compte le biais et la dispersion de la distribution d'incertitude. Plus la distribution est bonne, plus la valeur de C_1 est faible.

Dans un deuxième temps, nous déterminons à quel quantile de la distribution d'incertitude correspond la probabilité théorique. Plus cette probabilité théorique est proche de la médiane de la distribution d'incertitude, meilleure est la méthode. Nous définissons alors le critère C_2 par :

$$C_2(p) = \sum_{i=0}^n p_i(p) \left(\frac{1}{2} - q_i(p) \right)^2 \quad [3]$$

où q_i est le quantile de la distribution d'incertitude π_i correspondant à p .

C_2 est donc l'espérance du carré de la différence entre la position de p sur la distribution d'incertitude et la médiane de la distribution d'incertitude. Meilleure est la distribution, plus petite est la valeur de C_2 .

Pour chacune des méthodes en compétition, la valeur des deux critères a été calculée numériquement pour $p = \frac{1}{1000}$ à $\frac{1}{2}$ (pour des raisons de symétrie, l'intervalle $[0.5, 1[$ n'est pas étudié) avec un pas de $\frac{1}{1000}$. Nous pouvons représenter les critères C_1 et C_2 en fonction de p (Figure 1).

REMARQUE. — Le critère C_2 n'est représenté que sur l'intervalle $]0,0.1]$ car au delà les 4 méthodes donnent des résultats sensiblement égaux.

3.2. Discussion

Selon le critère C_1 , la méthode de Haldane (*a priori* $\beta(0, 0)$) est la meilleure des quatre testées pour des probabilités inférieures à 0.15 alors que l'*a priori* $\beta(1, 1)$ donnent les moins bons résultats. A l'inverse, pour des probabilités supérieures à 0.2,

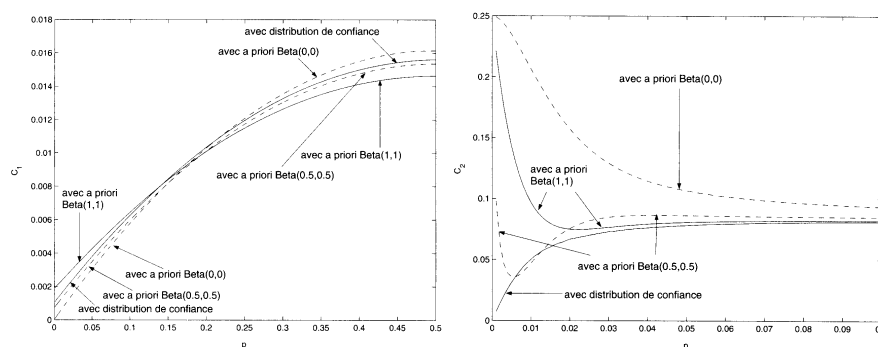


Figure 1. Relation entre p et les critères C_1 et C_2 pour un échantillon de taille 30 : (1) critère C_1 , (2) critère C_2

c'est la distribution basée sur l'*a priori* $\beta(1, 1)$ qui est la meilleure et celle sur l'*a priori* $\beta(0, 0)$ la moins bonne. Toujours selon C_1 , la méthode basée sur les distributions de confiance et celle sur l'*a priori* de Jeffrey $\beta(\frac{1}{2}, \frac{1}{2})$ donnent des résultats sensiblement égaux, avec un léger avantage toutefois à l'approche bayésienne. Ces deux méthodes (distribution de confiance et *a priori* $\beta(\frac{1}{2}, \frac{1}{2})$) sont en fait encadrées par les distributions d'incertitude issues des *a priori* $\beta(0, 0)$ et $\beta(1, 1)$.

Selon le critère C_2 , la méthode de Haldane donne les plus mauvais résultats et ce quel que soit p . C_2 montre également l'inconvénient d'utiliser l'*a priori* $\beta(1, 1)$ pour des proportions théoriques très faibles (inférieures à 0.02), tout à fait vraisemblables en microbiologie alimentaire. Le deuxième critère illustre également la proximité de la distribution de confiance avec la solution basée sur l'*a priori* $\beta(\frac{1}{2}, \frac{1}{2})$, même si cette fois-ci l'approche fréquentiste semble meilleure, notamment pour des probabilités extrêmement faibles (inférieures à $\frac{1}{200}$).

Enfin, nous pouvons signaler que plus la taille de l'échantillon augmente, plus la différence entre les méthodes s'estompe (résultats non présentés).

Au vu de ces résultats, nous recommandons l'usage de la distribution de confiance ou de la solution bayésienne calculée avec un *a priori* $\beta(\frac{1}{2}, \frac{1}{2})$ pour obtenir une distribution d'incertitude sur une proportion pour des échantillons de faible dimension.

4. Bibliographie

- [LIN 00] LINDQVIST R., WESTOO A., « Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden », *International Journal of Food Microbiology*, vol. 58, 2000, p. 181-196.
- [SCH 02] SCHWEDER T., HJORT N. L., « Confidence and Likelihood », *Scandinavian Journal of Statistics*, vol. 29, n° 2, 2002, p. 309-332.
- [VOS 00] VOSE D., *Risk Analysis*, Wiley, 2000.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

International Journal of Food Microbiology 91 (2004) 119–127

INTERNATIONAL JOURNAL OF
Food Microbiologywww.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

A contribution to the improvement of *Listeria monocytogenes* enumeration in cold-smoked salmon

Nathalie Gnanou Besse^{a,*}, Nelly Audinet^a, Annie Beaufort^b, Pierre Colin^c,
Marie Cornu^b, Bertrand Lombard^a

^a Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Afssa Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur l'Hygiène et la Qualité des Aliments, Afssa LERHQA, 39-41 rue du 11 Novembre, 94700 Maisons Alfort, France

^b Afssa, Laboratoire d'Etudes et de Recherches pour l'Alimentation Collective, Afssa LERAC, 22 rue Pierre Curie, BP 332, 94709 Maisons Alfort Cedex, France

^c Afssa Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie des Poissons, Afssa LERPP, BP 70, 29280 Plouzane, France

Received 28 October 2002; received in revised form 6 June 2003; accepted 21 June 2003

Abstract

For the enumeration of *Listeria monocytogenes* in food, a sensitive enumeration method based on membrane filtration followed by transfer of the filter to a selective medium has been developed. This study was carried out with cold-smoked salmon, a product likely to be contaminated with *L. monocytogenes*. The operating protocol utilizes three filtration runs in parallel (5, 15 and 30 ml) of a 1 in 10 dilution of the salmon suspension through 0.45- μ m pore-size cellulose ester membranes, and then culture of the filters on Aloa agar (AES Laboratoires, Combours, France). The results obtained with the technique were compared with those from the reference EN ISO 11290-2 method and found to provide more precise results in the enumeration of *L. monocytogenes* from both artificially and naturally contaminated cold-smoked salmon. Moreover, for several samples contaminated at low levels, *L. monocytogenes* could be recovered only by the filtration method. The examination of increasing volumes of salmon suspension enabled readable results to be obtained for all levels of *L. monocytogenes* and competitive microflora investigated. In most cases, the optimised operating protocol enabled 5.1 g of salmon to be examined, instead of 0.01–0.1 g with the reference EN ISO 11290-2 method, thus improving the sensitivity of the method. © 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; Enumeration; Filtration; Microbiological methods; Cold-smoked salmon

1. Introduction

Despite its low incidence, food-borne listeriosis can be characterised by the seriousness of symptoms

and a high rate of lethality, up to 30% (Anonymous, 2000). In addition, detection of *Listeria monocytogenes* in food involves important economic consequences like withdrawal of products and decrease of sales for incriminated products.

Vacuum-packed cold-smoked fish is a ready-to-eat product processed by a method that does not inactivate *L. monocytogenes* (Anonymous, 1999). After processing, the product is packaged and stored for a

* Corresponding author. Tel.: +33-1-49-77-11-10; fax: +33-1-49-77-11-02.

E-mail address: n.besse@afssa.fr (N. Gnanou Besse).

varying time, i.e., 3–6 weeks after the date of production, at refrigeration temperatures before consumption, allowing potential growth of *L. monocytogenes* (Anonymous, 1999, 2000). These products are mainly eaten without heat treatment, with the risk of consuming products contaminated with *L. monocytogenes*. However, no outbreak of listeriosis has yet been associated with the consumption of smoked fish (Anonymous, 1999), except an outbreak of listeriosis with a low number of cases (eight cases, two deaths), which was linked to “gravad” trout and cold-smoked rainbow trout in Sweden in 1994–1995 (Ericsson et al., 1997). An association between sporadic human listeriosis and consumption of cold-smoked fish is suggested, based on a characterisation of *L. monocytogenes* strains isolated from patients and from fish products (Loncaveric et al., 1998). Several studies reveal a relatively high prevalence of *L. monocytogenes* in such products, ranging from 5% to 60%, most of the surveys indicating a 15–20% prevalence (Richard et al., 1996; Anonymous, 1998a, 1999; Cohen Maurel, 1999; Johansson et al., 1999). The contamination levels are usually low, less than 100 CFU g⁻¹, and levels rarely exceed 10³ CFU g⁻¹ at consumption (Anonymous, 1998a, 1999). Such data indicating a relatively high incidence have raised concern about *L. monocytogenes* in cold-smoked fish, and over several years, studies using predictive microbiology, epidemiology, and quantitative risk assessment have been carried out (Cortesi et al., 1997; Dalgaard and Jorgensen, 1998; Jorgensen and Huss, 1998; Johansson et al., 1999; Lindqvist and Westöo, 2000; Fønnesbech Vogel et al., 2001). However, despite this interest, an adequate enumeration method is still lacking, which is essential to provide reliable data for both research studies and routine analysis. In most cases, *L. monocytogenes* was enumerated in cold-smoked fish using most probable number (MPN) technique (Cortesi et al., 1997; Dalgaard and Jorgensen, 1998), direct enumeration by spread plating on selective agar (Jorgensen and Huss, 1998), or semiquantitative determination (Jorgensen and Huss, 1998).

The European and International Standard method for enumeration of *Listeria* EN ISO 11290-2 (Anonymous, 1998b) is characterised by a limit of enumeration of 10–100 CFU g⁻¹, and the method does not seem to be well adapted to the examination of cold-

smoked fish products and, more generally, of food products which are usually contaminated at low levels, <100 CFU g⁻¹ (Anonymous, 1998a). In several countries and for specific products, the level of contamination accepted at consumption is <100 CFU g⁻¹ (Anonymous, 2000).

Several attempts to enumerate *L. monocytogenes* with the MPN technique (Yu and Fung, 1993; Bly-sick-McKenna and Schaffner, 1994; Yu et al., 1995; Cortesi et al., 1997; Dalgaard and Jorgensen, 1998) or with methods based on molecular biology (Wang and Hong, 1999; Nogva et al., 2000) have been reported. These methods do not always provide accurate results (Wang and Hong, 1999; Nogva et al., 2000), and they may be difficult to use for routine analysis.

Another approach to improve the sensitivity of the enumeration method would be to use a concentration technique, such as membrane filtration. This method is already widely used for microbiological analysis of water and liquids. Several studies have already dealt with the improvement of food suspension filterability, in order to adapt this technique to the analysis of solid products (Sharpe et al., 1979, 2000; Peterkin and Sharpe, 1980; Peterkin et al., 1982). Detection of target strains can then be achieved through culture of the membrane on selective agar or through various rapid techniques, such as, for example, direct epifluorescence technique (DEFT) or immunoassays. The hydrophobic grid membrane filtration (HGMF) technique, including a filtration stage, has been widely tested and is already validated by AOAC International for several bacterial species in food (Entis, 1986, 1989, 1990; Entis and Lerner, 2000). Recently, membrane filtration was applied to the detection and enumeration of *L. monocytogenes* (Hale et al., 1990; Jehanno et al., 1999; Carroll et al., 2000; Entis and Lerner, 2000; Gnanou Besse and Lafarge, 2001).

We have developed an enumeration method involving membrane filtration and incubation on agar medium for *L. monocytogenes* in cold-smoked fish product. Firstly, filterability of cold-smoked salmon has been optimised with respect to filtration temperature, prefiltration, dilution rate, type of diluent, rinsing of the filter, and addition of enzymes and surfactant, and secondly, the optimal culture conditions after membrane filtration (selective media, incubation temperature, etc.) have been evaluated with artificially and naturally *L. monocytogenes* contami-

nated samples. A resuscitation step on solid nonselective agar was also investigated, but results were unsatisfactory, suggesting poor performance of the resuscitation step, or presence of limited stressed *Listeria* population in such products. Examination of cold-smoked salmon with the standard method with resuscitation both in liquid or solid media yielded similar results.

The objective of this work was to evaluate the standardised operating protocol and to compare it to the ISO 11290-2 reference method.

2. Materials and methods

2.1. Strains and samples

2.1.1. Bacterial strains and preparation of inocula

Experiments were carried out with three different strains of *L. monocytogenes* serovar 1/2a (strains 42 LM, 46 LM, and 47 LM, Afssa LERHQA collection), isolated from cold-smoked salmon and characterised in our laboratory. A stock culture was maintained at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in cryobank (AES Laboratoires, Combourg, France). Appropriate dilutions of *L. monocytogenes* cultures grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth (CM 225, Oxoid, Dardilly, France) for 24 h as two successive cultures of 6 and 18 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ served as inocula for tests. The final BHI culture usually contained around 1×10^9 CFU ml^{-1} . All decimal dilutions were prepared in Tryptone Salt (TS, 42 076 bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.1.2. Cold-smoked salmon samples

For experiments using artificial contamination, cold-smoked salmon were purchased locally, divided into 25-g portions and stored at $3 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, or if necessary at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, in Stomacher® bags with a mesh screen liner with 280- μm pore size (Bagpage Plus 400, Intersciences, Saint-Nom La Bretèche, France) which removed any large salmon particles after the peristaltic homogeniser treatment. When frozen, the samples were thawed a night before use at $3 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Absence of *L. monocytogenes* in each purchased cold-smoked salmon was previously checked according to the ISO 11290-1 reference method (Anonymous, 1996). Results showed that no

product used in these studies was contaminated by *Listeria*. For artificial contamination, 25-g samples were spiked with a low volume (around 1 ml) of appropriate TS dilution of *L. monocytogenes* culture prepared as described below, gently mixed, and left for 1 night at $3 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ before use. Rates of contamination ranged from 0.3 to 30 CFU g^{-1} .

Most of the naturally contaminated samples were received from Afssa LERAC laboratory (Afssa Laboratoire d'Etudes et de Recherches pour l'Alimentation Collective), which studied the prevalence of *L. monocytogenes* in vacuum-packed cold-smoked salmon sold at retail in France. Thirty five naturally contaminated samples were collected from six different cold-smoked salmon French processors for 1 year. They were analysed at the "best before" date or a few days later. If possible, samples were analysed without having been frozen at the laboratory. When it was necessary, they were stored and frozen as previously described. Approximately 20% of the samples were kept for 1–3 weeks at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. *L. monocytogenes* enumeration using filtration method

2.2.1. Filtration apparatus

Filtration was carried out using standard commercial Pyrex apparatus, and a vacuum pump with a maximum vacuum power of 630–635 mm Hg (around 80–85 kPa) (XX 55 220 50 Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). A 4.7-cm diameter and 0.45- μm pore-size membrane, composed of mixed cellulose esters (Millipore HAWP 047 00) and single-use filtration units with an effective 12.25- cm^2 filtration area (MicroFunnel™ Filter Funnels, 4800, Pall Gelman Sciences, Champs sur Marne, France), were used.

2.2.2. Reagents

A 10% sample of Tween 80 (P 4780, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) or trypsin 1/250 (Difco 0152-13-1) stock solutions were prepared everyday in phosphate buffer pH 7.5 containing 20 g dipotassium phosphate (Merck 10 5104) per litre of deionized water and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Unfiltered Tween or trypsin stock solutions contained no detectable level of *Listeria* and, consequently, could also be used without sterilisation.

2.2.3. Protocol

The protocol of the enumeration method is shown in Fig. 1. Samples were homogenised in TS diluent (1 in 10 dilution) for 1 min at normal speed using a Stomacher® apparatus (Stomacher 400, Seward, London, UK). Cold-smoked salmon suspensions of 5, 15, and 30 ml were immediately treated for 20–25 min at 37 °C in a water-bath shaker with 0.83% Tween 80 and 0.83% trypsin (addition of 1 ml of each reagent per 10 ml suspension to filter) and filtered. The filters were laid on Aloa agar (AEB 520080, AES Laboratoires) containing (per liter) 18 g meat peptone, 6 g trypton, 10 g yeast extracts, 2 g sodium pyruvate, 2 g glucose, 1 g magnesium glycerophosphate, 0.5 g magnesium sulfate, 5 g sodium chloride, 10 g lithium chloride, 2.5 g anhydric disodium hydrogen phosphate, 0.05 g 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucopyranoside, 0.02 g nalidixic acid sodium salt, 0.02 g ceftazidim, 76700 IU polymixin B sulfate, 0.05 g cycloheximide, 0.01 g amphotericin B, 2 g L-phosphatidylinositol (Sigma P 6636), and 12–18 g agar, pH 7.2. The plates were incubated upside down for 48

h at 37 °C. The standard ISO 11290-2 method should be conducted in parallel.

For enumeration, colonies on filters containing less than 100 colonies were counted. All *L. monocytogenes* colonies obtained on readable filters were counted. The volume analysed (corresponding to the selected filters) was recorded in Results. *L. monocytogenes* colonies were blue without a halo, due to trypsin remaining on the filter. Consequently, all typical blue colonies had to be spot inoculated on an Aloa plate and incubated for approximately 4 h at 37 °C to read the halo formation. Then, five typical *L. monocytogenes* colonies were confirmed according to the EN ISO 11290-2 method.

2.3. Evaluation of *L. monocytogenes* recovery using artificially contaminated samples

Cold-smoked salmon samples spiked with varying concentrations of an equal cocktail of *L. monocytogenes* strains 42 LM, 46 LM, and 47 LM were enumerated according to the EN ISO 11290-2 refer-

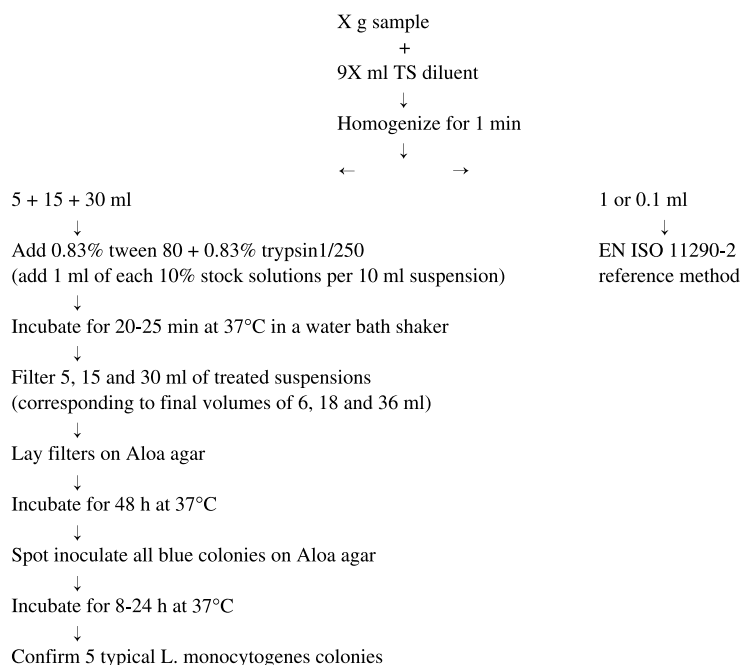


Fig. 1. Filtration method.

ence method and using the membrane filtration protocol. The standard method was modified by using TS diluent and by spreading 5 ml of the suspension on 15 plates in order to decrease the limit of enumeration and to approach the sensitivity of the filtration protocol. Previous studies with artificially and naturally contaminated samples had shown no differences in enumeration result, using TS or buffered peptone water diluent (unpublished data). For the filtration protocol, only 30-ml filtrations were carried out.

2.4. Evaluation of *L. monocytogenes* recovery using naturally contaminated cold-smoked salmon

2.4.1. First evaluation of the filtration method

Naturally contaminated cold-smoked salmon samples were enumerated according to the EN ISO 11290-2 reference method modified as described previously and using a filtration protocol. For each sample, the aerobic mesophilic microflora was enumerated using aerobic plate count Petrifilm™ (06400, 3M Laboratoires, Cergy-Pontoise, France) incubated for 72 h at 30 °C.

The aim of this study was to evaluate performances of the filtration method through the analysis of numerous naturally contaminated samples with various background microflora levels and potentially stressed *L. monocytogenes* populations compared to the reference method. This study was also useful to indicate any potential toxicity of the combined Tween and trypsin treatment towards stressed *L. monocytogenes*.

2.4.2. Comparison of the filtration method with the standard method

The same 10-fold dilution of naturally contaminated cold-smoked salmon was analysed five times in parallel both with the modified reference method and the filtration protocol. Results were converted in \log_{10} for statistical analysis, which was performed according to the NF V03-110 AFNOR standard (Anonymous, 1998c): stability of precision was assessed with a Cochran test, repeatability variances were compared with a Fisher test, and relative accuracy of the methods was evaluated by comparison of means.

2.4.3. Statistical analysis

Different statistical tests, according to the AFNOR Standard NF V 03-110, were used.

The Cochran test was used to check that all sample variances did not differ statistically and that the precision was stable all over the scope of the method. The ratio C_{obs} is calculated as follows:

$$C_{\text{obs}} = \frac{s_{\text{max}}^2(x)}{\sum_{i=1}^p s_i^2(x)},$$

where $s_{\text{max}}^2(x)$ is the highest variance, and p is the number of samples. This value is compared to the critical value of Cochran test, with an error risk α of 1%.

The repeatability variances of the filtration and reference methods were compared, using a Fisher test. The ratio q is calculated as follows:

$$q = \frac{s_r^2(x)}{s_r^2(z)},$$

where $s_r^2(x)$ is the largest repeatability variance of the method (either filtration or reference), and $s_r^2(z)$ is the repeatability variance of the other method.

This value is compared to the critical value of the Fisher variable $F(N(x)-p, N(z)-p, 0.99)$, with a confidence level of 99%, $N(x)-p$ and $N(z)-p$ degrees of freedom.

To assess the relative accuracy of the filtration method against the reference method, the means were compared. The w ratio is calculated as follows:

$$w = \frac{|\bar{d}|}{s_d},$$

where $\bar{d} = (\sum_i d_i)/p$ (d_i being the difference between the means of the filtration and the reference method for a given sample i), and $s(d) = \sqrt{(\sum_i (d_i - \bar{d})^2)/(p-1)}$ calculated for each sample. The ratio w is compared to the critical value 3.0, with an error risk α of 1%.

3. Results

3.1. Recovery of *L. monocytogenes* from artificially contaminated cold-smoked salmon

A close correlation between the known inoculum levels of *L. monocytogenes* and the levels enumerated using the new method was observed (Fig. 2). Regres-

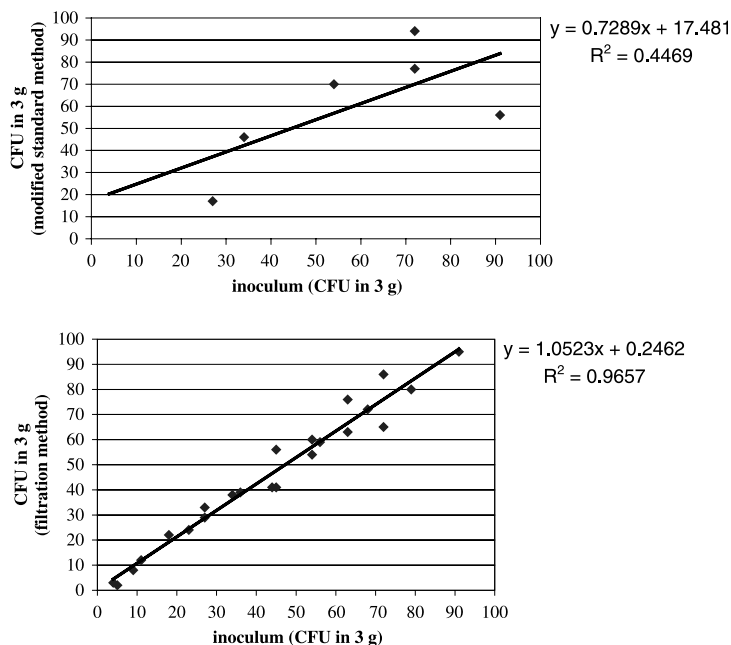


Fig. 2. Linearity study using artificially contaminated cold-smoked salmon: comparison of the enumeration results obtained by the modified standard method or the filtration method (30-ml filtrations), and the inoculum size.

sion analysis showed that there was a linear relationship between results obtained using filtration and inoculum concentration up to around 100 CFU g^{-1} (equation of the linear relationship: $\text{CFU g}^{-1} \text{ filtered} = 1.0523 \text{ CFU g}^{-1} \text{ inoculum concentration} + 0.2462$, $r^2 = 0.9657$). Fig. 2 shows that the test method yielded more accurate results (nearer to the true value) than the modified standard method, whose linearity was poor (equation of the linear relationship: $\text{CFU g}^{-1} = 0.7289 \text{ CFU g}^{-1} \text{ inoculum concentration} + 17.481$, $r^2 = 0.4469$).

3.2. Recovery of *L. monocytogenes* from naturally contaminated cold-smoked salmon

Aerobic plates counts ranged from 10^4 to 10^8 – 10^9 CFU g^{-1} (results not shown). With respect to the presence of background microflora on the membranes, results were very similar within samples belonging to a same lot number. In most cases, no or few background microflora colonies were observed on the filters; however, in a limited number of cold-smoked salmon lots (4:26), unreadable results were obtained

for the largest volumes examined because of over-growth. However, most cold-smoked salmon at retail level is likely to contain lower levels of aerobic microflora than our samples, which were examined at the end of their shelf-life.

During this study, 42 examinations of naturally contaminated cold-smoked salmon (35 different samples) have been performed both with the modified standard enumeration method and the filtration meth-

Table 1

Comparison of enumeration results obtained by the modified standard method and filtration method with naturally contaminated samples: results of five counts obtained by each method on the same sample

Method	Sample code			
	1	2	3	4
Standard method (CFU g^{-1})	10, 20,	18, 68,	4, 4,	2, 2,
	8, 34,	20, 42,	6, 6,	2, 1,
	10	28	2	1
Filtration method (CFU g^{-1})	18, 16,	48, 45,	8, 8,	2, 2,
	16, 17,	45, 43,	9, 7,	1, 1,
	17	46	10	1

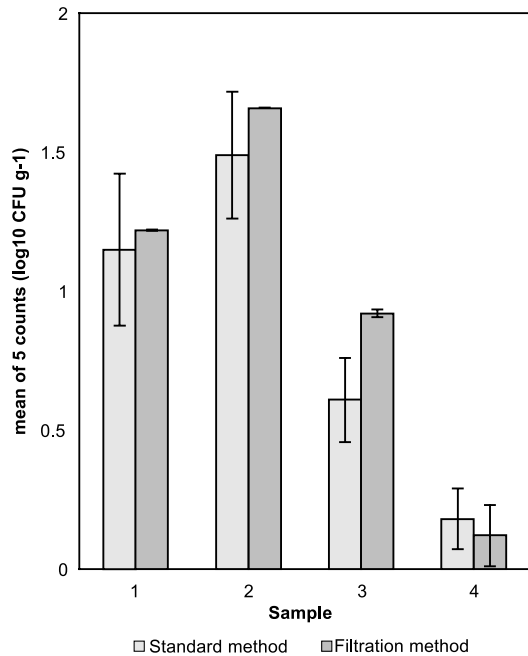


Fig. 3. Comparison of enumeration results obtained by the modified standard method and filtration method with naturally contaminated samples: mean of five counts obtained by each method on the same sample and standard deviation.

od. *L. monocytogenes* was recovered by both methods on 64.3% of occasions. On one occasion (2.4%), *L. monocytogenes* was recovered only by the modified standard method, and on 14 occasions (33.3%) *L. monocytogenes* was recovered only by the filtration method. When *L. monocytogenes* contamination levels were sufficient to compare methods, filtration method and standard method gave similar results.

3.3. Comparison of the filtration method with the standard method

Results are shown in Table 1 and Fig. 3. According to the statistical analysis of log₁₀ data in Table 1, the precision was stable for all samples tested and for the

reference method (Cochran test, $C_{\text{obs}} < C_{\text{crit}}$, $p < 0.01$) but not for the filtration method, due to the very low variances for three samples (0.000, 0.000, 0.003), the fourth having a relatively higher variance (0.027). The precision of filtration method ($s_r^2 = 0.006$) was significantly better (Fisher test, $p < 0.01$) than the precision of the standard method ($s_r^2 = 0.038$). Filtration method yielded accurate results when compared to the standard method (at $\alpha = 1\%$, where $w = 0.8$, $w_{\text{crit}} = 3.0$).

3.4. *L. monocytogenes* contamination levels of cold-smoked salmon

Of 35 different samples (some of them belonging to the same lot), 91.4% contained < 100 CFU g⁻¹, and 88.2% contained < 50 CFU g⁻¹ (Table 2). The percentage of samples containing less than 0.2 CFU g⁻¹ remains unknown: in some cases, the enumeration method did not allow to recover *L. monocytogenes* from samples which have not been tested with the detection protocol, but belonged to the same lot number than positive samples.

4. Discussion

The method that we have developed is relatively rapid (same duration as the standard method), easy to implement, and cheap; to achieve the same sensitivity (analysis of 50 ml of 1:10 fish suspension) without filtration, up to 150 petri dishes of selective agar would be necessary per sample (spreading 1 ml on three plates). Our protocol permits filtration of 5 g cold-smoked salmon diluted to 1:10, thereby decreasing the enumeration limit (10–100 CFU g⁻¹) of the reference method to 0.2 CFU g⁻¹. Moreover, it improves the precision, especially at low levels of contamination. The sensitivity of the method could possibly be increased still further if more filtrations were performed in parallel or by using filters of wider diameter.

The filtration method involves the use of a specific apparatus and is more laborious than the reference

Table 2

L. monocytogenes contamination in naturally contaminated cold-smoked salmon samples

Contamination level (CFU g ⁻¹)	0.2–1	1–25	25–50	50–75	75–100	>100	>1000
Samples number	11 (31.4%)	13 (37.1%)	6 (17.1%)	0 (0%)	2 (5.7%)	3 (8.6%)	0 (0%)

method. For one analysis, all filtrations usually take less than 5 min. However, some salmon samples may have a composition (high fat content) that could extend the filtration time. In those cases, gently mixing suspensions with a sterile plastic loop during filtration or transferring the cold-smoked salmon suspension into another Stomacher® bag with a mesh screen liner may be useful to limit filter silting and to accelerate filtration. The use of the same type of materials than the ones described here (Stomacher® apparatus, etc.) is also important to avoid filtration difficulties.

The method developed is also based on the use of Aloa agar. Special attention must be paid to some bacteria producing bluish colonies with halo (some *Bacillus cereus* strains and *Listeria ivanovii*) or bluish colonies (nonpathogenic *Listeria* and some enterococci and bacilli), which could induce false-positive presumptive results or, in the case of the filtration method, decrease the detection ratio (Vlaemyneck et al., 2000). However, in our study, no or few background microflora colonies were observed on the filters, and most bluish colonies were *Listeria* colonies. The good performances of this media have been demonstrated in terms of productivity ratio, selectivity and detection ratio (Vlaemyneck et al., 2000), and it has been adopted in 2002 by the International Organization for Standardization as the official media for *L. monocytogenes* standard detection and enumeration methods.

The protocol that we have developed improves the specificity and the reproducibility and repeatability of the method, as compared to the current reference method, since the selected isolation medium, Aloa, permits differentiation of the different *Listeria* species. Of the naturally contaminated cold-smoked salmon of various origin examined in this study, only one shown to be contaminated by *L. monocytogenes* contained other *Listeria* species. It was the only one examined several days before the “best before” date. The lack of diversity of *Listeria* species in our samples could be explained by their long storage duration, which may have allowed a competition between *Listeria* strains (Kalmokoff et al., 1999), and thus, one species or one strain to dominate. Further studies are necessary to assess this phenomenon.

Low contamination levels found in this study at the “best before” date confirm previous studies indicating

generally very low contamination levels of cold-smoked salmon (Anonymous, 1998a, 1999). These results highlight the need for a sensitive enumeration method, such as a filtration method, for examining this type of products.

Acknowledgements

This study is part of an Afssa project entitled “Construction of an interdisciplinary step to describe the sanitary process modulating the exposure to hazards of *L. monocytogenes* in refrigerated products”.

References

- Anonymous, 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*: Part 1. Detection Method. International Standard ISO 11290-1. International Organisation for Standardisation, Geneva.
- Anonymous, 1998a. Le plan de surveillance 1993–1996 de la contamination des aliments par *Listeria monocytogenes*. Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, Le point sur. . . , no. 9.
- Anonymous, 1998b. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*: Part 2. Enumeration Method. International Standard ISO 11290-2. International Organisation for Standardisation, Geneva.
- Anonymous, 1998c. Analysis of agri-foodstuffs—Intralaboratory validation procedure for an alternative method compared to a reference method—case of quantitative analysis methods. AF-NOR NF V03-110. Association Française de Normalisation, Paris.
- Anonymous, 1999. Report of the FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products, May 1999. Amherst, MA, United States. 34 pp.
- Anonymous, 2000. Rapport de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*, Juillet 2000, AFSSA. Maisons Alfort: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. 143 pp.
- Blystick-McKenna, D.N., Schaffner, D.W., 1994. Prediction of most probable number of *Listeria monocytogenes* using a modified FDA *Listeria* isolation method. Journal of Food Protection 57, 1052–1056.
- Carroll, S.A., Carr, L.E., Mallinson, E.T., Lamichanne, C., Rice, B.E., Rollins, B.M., Joseph, S.W., 2000. Development and evaluation of a 24-hour method for the detection and quantification of *Listeria monocytogenes* in meat products. Journal of Food Protection 63, 347–353.
- Cohen Maurel, E., 1999. Qualité et sécurité des poissons fumés à froid—*Listeria* dans le saumon. Process 1145, 44–45.

- Cortesi, M.L., Sarli, T., Santoro, A., Murru, N., Pepe, T., 1997. Distribution and behaviour of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 °C and 10 °C. *International Journal of Food Microbiology* 37, 209–214.
- Dalgaard, P., Jorgensen, L.V., 1998. Predictive and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 40, 105–115.
- Entis, P., 1986. Hydrophobic grid membrane filter method for aerobic plate count in foods: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69, 671–676.
- Entis, P., 1989. Hydrophobic grid membrane filter/MUG method for total coliform and *Escherichia coli* enumeration in foods: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72, 936–950.
- Entis, P., 1990. Hydrophobic grid membrane filter method, using EF-18 agar, for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 73, 734–742.
- Entis, P., Lerner, I., 2000. Twenty-four-hour direct presumptive enumeration of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples using the ISO-GRID method with LM-137 agar. *Journal of Food Protection* 63, 354–363.
- Ericsson, H., Eklow, A., Danielsson-Tham, M.-L., Loncaveric, S., Menting, L.-O., Persson, I., Unnerstad, H., Tham, W., 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2904–2907.
- Fomesbech Vogel, B., Vigel Jorgensen, L., Ojeniyi, B., Henrik Huss, H., Gram, L., 2001. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smoke-houses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *International Journal of Food Microbiology* 65, 83–92.
- Gnanou Besse, N., Lafarge, V., 2001. Development of a membrane filtration method for enumeration of *Listeria monocytogenes* from soft cheese. *Food Microbiology* 18, 669–676.
- Hale, K.A., Doores, S., Walsh, R.A., 1990. An enzyme/surfactant treatment and filtration technique for the retrieval of *Listeria monocytogenes* from ice cream mix. *Food Structure* 9, 61–67.
- Jehanno, D., Thuault, D., Drouet, X., 1999. Dénumbrer *Listeria monocytogenes* dans les produits carnés. *Adria Quimper France. Viandes et Produits Carnés* 20, 87–91.
- Johansson, T., Rantala, L., Palmu, L., Honkanen-Buzalski, T., 1999. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. *International Journal of Food Microbiology* 47, 111–119.
- Jorgensen, L.V., Huss, H.H., 1998. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology* 42, 127–131.
- Kalmokoff, M.L., Daley, E., Austin, J.W., Farber, J.M., 1999. Bacteriocin-like inhibitory activities among various species of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology* 50, 191–201.
- Lindqvist, R., Westöö, A., 2000. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. *International Journal of Food Microbiology* 58, 181–196.
- Loncaveric, S., Danielsson-Tham, M.-L., Gerner-Smidt, P., Sahlstrom, L., Tham, W., 1998. Potential sources of human listeriosis in Sweden. *Food Microbiology* 15, 65–69.
- Nogva, H.K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A., Lillehaug, D., 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4266–4271.
- Peterkin, P.I., Sharpe, A.N., 1980. Membrane filtration of dairy products for microbiological analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 1138–1143.
- Peterkin, P.I., Sharpe, A.N., Warburton, D.W., 1982. Inexpensive treatment of frozen dairy products for membrane filtration. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 486–487.
- Richard, N., Audiger, M.-T., Beaudoin, B., Duval, M., Gey, J.L., Jardy, N., Jouvenel, A., Michard, J., Rosec, J.P., 1996. Fréquence de contamination d'aliments du marché français de détail par les différentes espèces de *Listeria*. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 14, 255–262.
- Sharpe, A.N., Peterkin, P.I., Dudas, I., 1979. Membrane filtration of food suspensions. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 21–35.
- Sharpe, A.N., Hearn, E.M., Kovacs-Nolan, J., 2000. Comparison of membrane filtration rates and Hydrophobic Grid Membrane Filter coliform and *Escherichia coli* counts in food suspensions using paddle-type and pulsifier sample preparation procedures. *Journal of Food Protection* 63, 126–130.
- Vlaemynck, G., Lafarge, V., Scotter, S., 2000. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of Aloa, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *Journal of Applied Microbiology* 88, 430–441.
- Wang, C., Hong, C., 1999. Quantitative PCR for *Listeria monocytogenes* with colorimetric detection. *Journal of Food Protection* 62, 35–39.
- Yu, L.S.L., Fung, Y.C., 1993. Five-tube most-probable-number method using the Fung-Yu tube for enumeration of *Listeria monocytogenes* in restructured meat products during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 18, 97–106.
- Yu, L.S.L., Prasai, R.K., Fung, Y.C., 1995. Most probable numbers of *Listeria* species in raw meats detected by motility enrichment. *Journal of Food Protection* 58, 943–945.

OCCURRENCE AND SUBTYPING OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATES IN SMOKED SALMON IN FRANCE

A. KEROUANTON-LE GALL¹, M. MARAULT¹, A. BEAUFORT², M. CORNU², S. RUDELLE², A. BRISABOIS¹.

AFSSA - Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et sur les Procédés agroalimentaires (LERQAP), Maisons-Alfort, France.

¹ Unité Caractérisation et Epidémiologie Bactérienne (CEB)

² Unité Microbiologie Quantitative et Estimation des Risques (MQER)

L'objectif de cette étude était de détecter et de caractériser des souches de *Listeria monocytogenes* isolées d'échantillons de saumon fumé afin d'évaluer les différentes situations de contamination dans les usines française de production de saumon fumé. Durant 21 mois, en 2001 et en 2002, 8 usines représentant les différentes tailles de production existantes en France, ont été sélectionnées pour participer à cette étude. Trois cent échantillons de saumon fumé ont été analysés au stade de la sortie usine alors que pour 262 autres, les prélèvements ont été réalisés au stade de la distribution. La recherche de *L. monocytogenes* a été réalisée selon la méthode ALOA décrite et validée par l'AFNOR.

La prévalence était de 3,3 % pour les produits « sortie usine » et 10,3 % pour les produits à la distribution. Un total de 423 souches de *L. monocytogenes*, provenant des 8 usines sélectionnées et de divers laboratoires publics ou privés, ont été analysées par sérotypage et typage moléculaire par électrophorèse en champ-pulsé (PFGE). Les souches de *Listeria monocytogenes* étaient en majorité de sérotype 1/2a (78 %) alors que seulement 3 souches étaient de sérotype 4b. Les autres sérotypes identifiés étaient 1/2b, 1/2c, 3 a and 3b. L'analyse des résultats, après macrorestriction de l'ADN total par les enzymes *Apal* and *Ascl* et migration des fragments obtenus par électrophorèse en champ-pulsé, nous a permis d'identifier 33 et 27 profils différents pour *Apal* and *Ascl* respectivement. Certains de ces profils étaient très spécifiques d'une usine de production alors que d'autres étaient plus communément retrouvés dans les différentes entreprises.

La diversité des profils était faible pour les souches isolées dans les saumons fumés provenant des 8 entreprises, avec 1 à 4 profils combinés *Ascl* / *Apal* maximum, alors que le polymorphisme était beaucoup plus important pour les souches provenant des différents laboratoires publics ou privés.

En conclusion, ces résultats de caractérisation permettent d'identifier la présence d'une population de souches capables de s'implanter durant une longue période dans une entreprise. De plus, les profils de ces souches montrent qu'elles semblent spécifiquement associées à une entreprise. A l'inverse, certains profils sont communs aux différentes usines et à d'autres origines. On peut également souligner la rareté du sérotype 4b dans ces échantillons de saumon fumé ce qui pourrait expliquer pourquoi, malgré une prévalence parfois relativement importante, aucune épidémie liée à ce produit n'a été déclarée à ce jour en France.

Les résultats de cette étude doivent être compilés avec d'autres données, notamment de croissance, pour évaluer l'exposition au danger *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé.

ANNEXE. SUIVI THERMIQUE DES PRODUITS ALIMENTAIRES RÉFRIGÉRÉS AU COURS DE LA CHAÎNE DU FROID

Rédigé d'après : Rapport Cemagref, Afchain A.L., DerensE;, Guilpart J. Couplage de modèles thermique et microbiologique en vue de l'évaluation de l'exposition à un risque sanitaire.

Campagnes de mesures

Les profils thermiques des saumons fumés ont été analysés sur la base de trois campagnes de mesures réalisées par l'unité SRPI de l'Afssa avec la collaboration du Cemagref.

La **première campagne** de mesures a porté sur 51 saumons fumés et a été réalisée à partir de 4 usines. Les produits étaient appareillés dans l'usine puis suivis, le plus souvent, jusqu'à la plate-forme de distribution ou, dans quelques cas, jusqu'au meuble de vente. A partir de chaque usine, un ou deux circuits ont été suivis, et pour chaque suivi 10 produits au maximum étaient appareillés avec un capteur thermique.

La **deuxième campagne** a permis de suivre 81 saumons fumés de la plate-forme jusqu'à la consommation. Sept expérimentations ont été réalisées. A partir de chacune des 7 plate-formes, 20 produits au maximum étaient appareillés avec un capteur thermique puis suivis jusqu'à la mise en rayon. Lors de la journée suivant la mise en rayon, les consommateurs étaient informés de la présence d'un objet (qui n'était pas explicitement désigné comme un capteur thermique) sur le produit acheté et invité à le renvoyer par enveloppe pré-affranchie.

Pour ces deux campagnes et tous les maillons, un biais non-sécuritaire (minimisant les températures et donc le risque) est possible puisque nous étions présents sur le terrain et avons donc ainsi pu influencer le comportement des professionnels et des consommateurs. A l'inverse, en ce qui concerne le meuble de vente, un biais sécuritaire (maximisant les températures et donc le risque) est possible puisque les produits ont en majorité été suivis sur les heures d'ouverture du magasin. Ainsi, les périodes *a priori* plus froides, les nuits et les journées de fermeture, étaient sous-représentées.

Enfin, les durées de vie de 195 produits dans les meubles de vente ont été obtenues à partir d'une **troisième campagne**. Lors d'une mise en rayon d'un carton, chaque produit était marqué (à l'aide d'une gommette), puis les produits marqués étaient comptés au début ou à la fin de chaque journée d'ouverture. Toutes les dates d'achat ont ainsi pu être reconstituées.

Par ailleurs, une **quatrième campagne** de mesures, n'ayant pas porté sur des saumons fumés, mais sur des plats préparés, de durée de vie proche et de même température réglementaire (4°C), a également été prise en compte. Dans cette étude, effectuée par le Cemagref pour l'ANIA, la vie du produit réfrigéré était suivie en continu de la fabrication jusqu'au bout de la chaîne du froid, chez le consommateur. De plus, elle était réalisée en aveugle tout au long de la chaîne du froid, c'est-à-dire que les capteurs thermiques mis en place dès l'étape de fabrication étaient cachés par le conditionnement et donc que les personnes manipulant les produits (professionnels ou consommateurs) n'étaient pas au courant qu'un suivi thermique était en cours. Le biais venant du comportement des personnes est ainsi éliminé, ce qui est un avantage. A contrario, une incertitude est introduite quant à l'interprétation des courbes de températures en terme de succession de maillons.

Séquençage de la chaîne du froid en différents maillons

De façon très classique, la chaîne du froid d'un produit alimentaire a été considérée comme une succession de maillons. On distingue :

- Maillon Usine (U) : il part de l'instrumentation du produit (mise en place des capteurs dans le produit) jusqu'au départ du produit de l'usine comprenant le chargement des produits dans le véhicule ;
- Maillon Transport frigorifique (T) : il commence à la fermeture des portes des véhicules jusqu'à l'arrivée du véhicule à sa destination avec l'ouverture des portes du véhicule ; le déchargement des produits est inclus dans l'étape suivante ;

- Maillon Entrepôt (E) : il débute au moment du déchargement du véhicule jusqu'au chargement dans un autre véhicule ;
- Maillon Plate-forme (P) : il débute au moment du déchargement du véhicule jusqu'au chargement dans un autre véhicule ;
- Maillon Chambre froide de magasin (C) : il correspond à la période pendant laquelle les produits sont stockés en chambre froide ;
- Maillon Meuble frigorifique de vente (M) : il se décompose en deux parties :
 - Réception des produits dans le magasin comprenant le déchargement du véhicule et la mise en meuble de vente,
 - Présentation des produits en meuble de vente jusqu'à l'achat par le consommateur ;
- Maillon Transport après l'achat (V pour voiture) : il commence au moment où le consommateur sort le produit du meuble et s'arrête au moment où il le met dans le réfrigérateur domestique ;
- Maillon Réfrigérateur (R) : il débute au moment où le consommateur place son produit dans le réfrigérateur ménager et s'arrête au moment où il consomme le produit ;
- Maillon conservation Domestique (D) : il correspond à la période de conservation domestique lorsque le produit est sorti du réfrigérateur domestique. Ce maillon n'existe que si les consommateurs sortent les produits du réfrigérateur domestique quelque temps avant la consommation. C'est plutôt lié à la nature du produit, et on l'observe pour le saumon fumé (3^e campagne de mesures) et non pour les plats préparés (4^e campagne de mesures).

Les données issues des 4 campagnes de mesure précédemment décrites ont été exploitées par le Cemagref, en retenant une séparation selon ces types de maillons.

Tableau 1 : Nombre de données par maillons, d'après les 1^{ère} et 2^e campagnes de mesures

Maillon i	Transport frigorifique (T)	Entrepôt (E)	Plate-forme (P)	Chambre froide (C)	Meuble frigorifique de vente (M)	Véhicule / Transport après l'achat (V)	Réfrigérateur domestique (R)	Conservation domestique à température ambiante (D)
Taille de l'échantillon : p_i	181	12	140	49	67	77	68	20

Tableau 2 : Nombre de données par maillons, d'après la 4^e campagne de mesures

Maillon i	Transport frigorifique (T)	Entrepôt (E)	Plate-forme (P)	Chambre froide (C)	Meuble frigorifique de vente (M)	Véhicule / Transport après l'achat (V)	Réfrigérateur domestique (R)	Conservation domestique à température ambiante (D)
Taille de l'échantillon : p_i	337	44	165	10	126	125	108	aucun

Résultats

Pour chaque maillon, les distributions de variabilité de la durée (d) et de la température moyenne (m) ont été caractérisées. Les résultats sont présentés ci-dessous (figures 1 et 2) pour les durées dans le maillon M (3^e versus 4^e campagne de mesures) et les températures moyennes dans le maillon R (2^e versus 4^e campagne de mesures). De plus, le tableau 3 récapitule les moyennes estimées. Enfin, une 3^e caractéristique (écart-type : s) a également été prise en compte pour les besoins du modèle de microbiologie prévisionnelle.

Figure 1 : Histogrammes des temps de séjour dans le meuble. A gauche : saumon fumé (3^e campagne de mesures). A droite : plats préparés (4^e campagne de mesures)

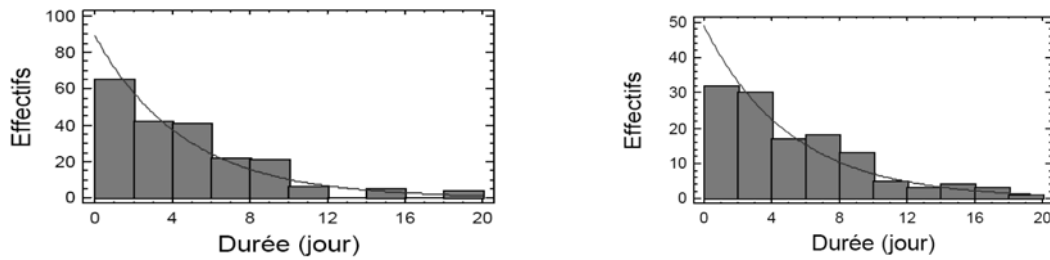


Figure 2 : Histogrammes des températures moyennes dans le réfrigérateur. A gauche : saumon fumé (2^e campagne de mesures). A droite : plats préparés (4^e campagne de mesures)



Tableau 3 : Moyennes des durées et températures moyennes pour l'ensemble des campagnes de mesures

Maillon	Saumon fumé		Plats préparés	
	Moyenne des durées (jours)	Moyennes des températures moyennes (°C)	Moyenne des durées (jours)	Moyennes des températures moyennes (°C)
T	0,08	3,6	0,3	3,6
E	0,7	3,6	6,6	2,4
P	0,5	2,9	1,1	3,3
C	1,0	4,4	1,0	3,4
M	4,6	5,6	5,1	3,1
V	0,04	13	0,05	8,6
R	4,8	7,3	4,4	5,7

Comparaison des campagnes de mesure

Le projet LmPR (« étude AFSSA ») se fonde sur les trois premières campagnes de mesures, les résultats ont été comparés à ceux de la quatrième campagne de mesure (« étude ANIA »).

Durée / Temps de séjour :

- la durée moyenne des transports frigorifiques est différente dans les deux études. Elle est plus longue dans l'étude ANIA (4^e campagne de mesures sur les plats préparés) que dans l'étude AFSSA. Il faut noter ici l'influence peut-être d'une différence de méthodologie, à savoir que nous n'avons pas le même nombre de véhicules frigorifiques entre l'étude ANIA et l'étude AFSSA (337 véhicules dans l'ANIA très supérieurs au nombre de véhicules dans l'étude AFSSA car dans l'ANIA il y a un seul produit par véhicule, alors que dans l'AFSSA, plusieurs produits se retrouvent dans le même véhicule) ;
- la durée moyenne de séjour des produits dans les meubles frigorifiques de vente est très proche dans les deux cas (5,15 jours contre 4,6 jours). Il en est de même pour les réfrigérateurs domestiques (4,4 jours contre 4,8 jours) ; Ces deux valeurs de temps de séjour peuvent être considérées comme représentatives ;

- la durée d'un transport après l'achat est en moyenne d'1h04 ou d'1h12 selon l'étude : les durées moyennes sont statistiquement égales d'après le test de comparaison de moyennes (en terme de différence de moyenne nulle ou pas) ;
- le temps moyen de séjour en plate-forme est aussi différent d'une étude à l'autre. ; il est le double dans l'étude ANIA (1 jour contre 12 heures). Est-ce lié au produit ou au problème d'échantillonnage ? Notons que le terme plate-forme dans l'étude Ania regroupait aussi les grossistes où le temps de séjour est un peu plus important ;
- pour les entrepôts et les chambres froides, il est difficile de conclure en raison du faible nombre dans les deux études.

Température :

- pour les plates-formes, la température moyenne est proche de 3°C dans les deux études ;
- pour les transports frigorifiques, on obtient aussi une égalité pour la température moyenne (3,6°C) ;
- pour les entrepôts et les chambres froides, il est difficile de conclure en raison du faible nombre dans les deux études ;
- pour les meubles frigorifiques de vente, la température moyenne est de 3,1°C dans l'étude ANIA et de 5,6°C dans l'étude AFSSA. Cette différence, confirmée par les tests statistiques de comparaison de moyennes, est due au fait que l'enregistrement dans les meubles n'a été fait pour l'étude AFSSA que sur une seule journée, heures ouvrables (hors nuit) pour des raisons pratiques. Les données ANIA ont été obtenues dans des conditions réelles d'utilisation et sont plus représentatives ;
- pour le transport après l'achat, les températures moyennes sont élevées mais différentes (13°C pour l'étude AFSSA et 8,6°C pour l'étude ANIA), différence confirmée par un test statistique de comparaison de moyennes (en terme de différence de moyenne nulle ou pas). Peut-être, est-ce lié cette fois au produit, étant donné la très faible inertie thermique du saumon ? ;
- pour le dernier maillon qu'est le réfrigérateur domestique, les températures moyennes obtenues pour l'étude AFSSA (7,3°C) sont plus élevées que celles pour l'étude ANIA (5,7°C). Ceci peut être du, d'une part à la nature du produit (inertie thermique plus faible du saumon fumé), et d'autre part, au nombre de réfrigérateurs plus importants dans l'étude ANIA (108 au lieu de 68).