

ADVIES 02-2016

Betreft: Provocatietesten en houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in kaas (dossier SciCom 2015/17).

Advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 19 februari 2016.

Samenvatting

In Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van de Europese Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen worden o.a. microbiologische criteria vooropgesteld met betrekking tot kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor *Listeria monocytogenes* kunnen dienen. Teneinde aan deze criteria te voldoen, dienen in sommige gevallen studies uitgevoerd te worden. Hiertoe heeft het Europees referentielaboratorium voor *Listeria monocytogenes* (EURL Lm) een technisch richtsnoer opgesteld voor het uitvoeren van provocatietesten (challenge testen) en houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in kant-en-klare levensmiddelen. Deze testen hebben als doelstelling om het groeipotentieel of de maximale groeisnelheid van *Listeria monocytogenes* te beoordelen tijdens de houdbaarheidstermijn van kant-en-klare producten die op de markt gebracht worden. Verder heeft het FAVV een dienstnota opgesteld met verdere verduidelijking om tot een geharmoniseerde toepassing te komen van dit technisch richtsnoer in België.

Er werd aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd verduidelijking te verschaffen over dit bovenvermelde technisch richtsnoer en meer specifiek met betrekking tot het uitvoeren van provocatietesten en houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in kaas. Voor wat betreft de provocatietesten, worden vragen gesteld over de inoculatie, de metingen van de pH en a_w (wateractiviteit), de microbiologische analyses, de aanbevelingen voor de bewaar temperatuur- en duur en de extrapolatie van de resultaten naar andere kazen. Voor wat betreft de houdbaarheidstesten worden vragen gesteld over de metingen van de pH en a_w , de microbiologische analyses, de aanbevelingen voor de bewaar temperatuur- en duur, de extrapolatie van de resultaten naar andere kazen en het gebruik van houdbaarheidstesten als alternatief voor provocatietesten. Daarnaast worden enkele vragen gesteld over de interpretatie van het technisch richtsnoer.

In dit advies wordt een antwoord geformuleerd op de vragen. *Listeria monocytogenes* kan kaas contamineren via verschillende contaminatieroutes. Het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* kan bestudeerd worden door middel van provocatietesten en/of houdbaarheidstesten. Initiële contaminatie van kaas met *Listeria monocytogenes* kan afkomstig zijn van de (rauwe) melk die gebruikt werd voor de productie van de kaas, van de productieomgeving (apparatuur, gereedschap, infrastructuur, enz.) of van het personeel betrokken bij de productie, de rijping, de affinage, het versnijden en het verpakken van de kaas.

Een contaminatie die afkomstig is van de (rauwe) melk kan gesimuleerd worden door een inoculatie in melk die gebruikt wordt voor de productie van kaas (via een pilootstudie) of door een inoculatie in de kern van de kaas. De keuze van de wijze van artificiële inoculatie van

Listeria monocytogenes (inoculatie in de kern en/of op het (snij)oppervlak van de kaas) is afhankelijk van de meest waarschijnlijke contaminatieroute welke afhankelijk is van het type kaas, de fysisch-chemische eigenschappen, het productieproces van de kaas en de doelstelling van de opdrachtgever. Het inoculum kan de intrinsieke eigenschappen van het product ter hoogte van de injectiezones mogelijk wijzigen. Daarom wordt in het technisch richtsnoer gesteld dat de verhouding tussen het inoculum en het product niet hoger dan 1 % van de massa (of het volume) van de testeenheid mag zijn. Conform het technisch richtsnoer moet de inoculatie worden uitgevoerd na de rijping van de kaas op de eerste dag van de houdbaarheidstermijn (dag 0), m.a.w. het moment dat de kaas als kant-en-klaar levensmiddel op de markt wordt gebracht. Eventueel heeft de kaas een etiket dat de aanbevolen bewaarcondities specificeert. Conform het technisch richtsnoer dient het initieel contaminatieniveau ca. 100 kve (kolonievormende eenheden)/g te bedragen. Een geschat groeipotentieel van > 0,5 log-eenheden bij een initieel contaminatieniveau van 100 kve/g wordt niet als significant verschillend beschouwd ten opzichte van een te verwachten groeipotentieel bij een initieel contaminatieniveau van 10 kve/g. Provocatietesten dienen bij voorkeur uitgevoerd te worden met goed gekarakteriseerde stammen van *Listeria monocytogenes* zoals voorgeschreven in het technisch richtsnoer en niet met stammen van *Listeria innocua*.

Zowel voor provocatietesten als voor houdbaarheidstesten dienen de metingen van de pH en a_w op dag 0 en op de laatste dag van de houdbaarheid eenmaal op één monster per lot te gebeuren. Deze dienen te gebeuren in de kern en/of op het oppervlak van de kaas, ter hoogte van de plaats van inoculatie bij een provocatietest of overeenkomstig de meest waarschijnlijke contaminatieroute bij een houdbaarheidstest. De aanbevelingen voor bewaarduur en -temperatuur worden weergegeven in tabel 3 van het technisch richtsnoer en worden verder toegelicht in de dienstnota van het FAVV. De resultaten van provocatietesten en houdbaarheidstesten kunnen enkel geëxtrapoleerd worden naar loten van eenzelfde type kaas. Houdbaarheidstesten kunnen als alternatief dienen voor provocatietesten, indien er voldoende analyses werden uitgevoerd op zowel dag 0 als de laatste dag van de houdbaarheidstermijn.

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan om hygiënisch te werken, de koudeketen zo goed mogelijk te respecteren, kruiscontaminaties met *Listeria monocytogenes* te vermijden en om vanuit goede werk- en hygiënische praktijken (GMP en GHP) te streven naar afwezigheid van *Listeria monocytogenes* in kaas. Ten slotte worden enkele aanbevelingen gemaakt omtrent de interpretatie van het technisch richtsnoer.

Summary

Advice 02-2016 of the Scientific Committee of the FASFC on challenge tests and durability tests for *Listeria monocytogenes* in cheese

In Regulation (EC) No 2073/2005 of the European Commission of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, i.a. microbiological criteria are established concerning ready-to-eat foods able to support the growth of *Listeria monocytogenes*. In order to comply to this criteria, in some cases studies have to be performed. Therefore, the European reference laboratory for *Listeria monocytogenes* (EURL *Lm*) has established a technical guidance document for conducting challenge tests and durability tests for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. These tests aim to evaluate the growth potential or the maximum growth rate of *Listeria monocytogenes* during the shelf-life of ready-to-eat foods placed on the market. Furthermore, the FASFC prepared a service note with further clarification in order to achieve a harmonized application of this technical guidance document in Belgium.

The Scientific Committee was asked to provide clarification concerning the above-mentioned technical guidance document and in particular concerning the conducting of challenge tests and durability tests for *Listeria monocytogenes* in cheese. For challenge tests, questions are asked about the inoculation, the measurement of the pH and a_w (water activity), the

microbiological analyzes, the recommendations for the storage temperature and duration and the extrapolation of the results to other cheeses. For durability tests, questions are asked about the measurement of the pH and a_w , the microbiological analyzes, the recommendations for the storage temperature and duration, the extrapolation of the results to other cheeses and the utilization of durability tests as an alternative for challenge tests. Next to this, some questions are asked about the interpretation of the technical guidance document.

In this advice, an answer is formulated to the questions. *Listeria monocytogenes* can contaminate cheese via several contamination routes. The growth potential of *Listeria monocytogenes* can be studied by means of challenge tests and/or durability tests. An initial contamination of cheese with *Listeria monocytogenes* may come from the (raw) milk used to produce the cheese, from the production environment (equipment, tools, infrastructure, etc.) or from the staff involved in the production, ripening, affinage, cutting and packaging of the cheese.

A contamination coming from the (raw) milk can be simulated by means of inoculation of the milk that is used for the production of cheese (via a pilot study) or by means of inoculation in the core of the cheese. The choice of the way of artificial inoculation of *Listeria monocytogenes* (inoculation in the core and/or on the (cutting) surface of the cheese) depends on the most probable contamination route which depends on the type of cheese, the physical-chemical properties, the production process of the cheese and the aim of the customer. The inoculum can possibly change the intrinsic properties of the product at the level of the injection zones. Therefore, it is stated in the technical guidance document that the ratio of the inoculum and the product should not be higher than 1 % of the mass (or the volume) of the test unit. In accordance with the technical guidance document, the inoculation has to be conducted after the ripening of the cheese on the first day of the shelf-life (day 0), i.e. the moment that the cheese is placed on the market as a ready-to-eat food. Potentially, the cheese contains a label specifying the recommended storage conditions. In accordance with the technical guidance document, the initial contamination level has to be about 100 cfu (colony forming units)/g. An estimated growth potential of $> 0,5$ log units at an initial contamination level of 100 cfu/g is not considered as being significantly different in comparison with an expected growth potential at an initial contamination level of 10 cfu/g. Challenge tests should preferably be performed with well characterized strains of *Listeria monocytogenes* as prescribed in the technical guidance document and not with strains of *Listeria innocua*.

For challenge tests as well as for durability tests, the measurements of the pH and a_w have to be performed at day 0 and at the last day of the shelf-life one time on one sample per batch. They should be done in the core and/or on the surface of the cheese, at the level of the place of inoculation for a challenge test or in accordance with the most probable contamination route for a durability test. The recommendations for storage duration and temperature are given in table 3 of the technical guidance document and are further explained in the service note of the FASFC. The results of challenge tests and durability tests can only be extrapolated to batches of the same type of cheese. Durability tests can serve as an alternative for challenge tests if sufficient analyzes are performed on day 0 as well as on the last day of the shelf-life.

The Scientific Committee recommends to work in a hygienic way, to respect the cold chain as good as possible, to avoid cross contaminations with *Listeria monocytogenes* and to strive to absence of *Listeria monocytogenes* in cheese from the good manufacturing and hygienic practices (GMP and GHP). Finally, some recommendations are made regarding the interpretation of the technical guidance document.

Sleutelwoorden

Listeria monocytogenes, kaas, provocatietest (challenge test), houdbaarheidstest

1. Referentietermen

1.1. Vraagstelling

Er worden een aantal vragen gesteld aan het Wetenschappelijk Comité. Deze worden hieronder opgelijst.

Vragen betreffende provocatietesten (challenge testen) voor *Listeria monocytogenes* in kaas

1. met betrekking tot de inoculatie:
 - a. Hoe kan een contaminatie van melk die gebruikt wordt voor de productie van de kaas gesimuleerd worden?
 - b. Hoe dient de inoculatie uitgevoerd te worden (in de kern of op het oppervlak; per type kaas; welke methode)?
 - c. Verandert een injectie de intrinsieke eigenschappen van de kaas ter hoogte van de injectiezones?
 - d. Welke contaminatiemogelijkheden dienen gesimuleerd te worden (contaminatie van de melk, contaminatie tijdens of na de productie van de kaas, enz.)?
 - e. In welk stadium van de productie van de kaas dient de inoculatie te gebeuren (vóór of na de rijping)?
 - f. Kan een initieel contaminatieniveau van 10 kve (kolonievormende eenheden)/g gehanteerd worden om een meer realistische situatie na te bootsen?
 - g. Wetende dat het initieel contaminatieniveau de factor is die het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* het meest beïnvloedt, wordt gevraagd of een groeipotentieel groter dan 0,5 log-eenheden gelijk is bij een initieel contaminatieniveau van 100 kve/g en bij een initieel contaminatieniveau van 10 kve/g?
 - h. Kan een groeipotentieel groter dan 0,5 log-eenheden gebruikt worden voor het bepalen van de finale houdbaarheidsstermijn van *Listeria monocytogenes* en voor het bepalen van een intermediaire limietwaarde waarbij het criterium van 100 kve/g gerespecteerd wordt?
 - i. Kunnen provocatietesten met *Listeria innocua* geaccepteerd worden en indien ja, waar dient deze stam gehaald te worden?
2. Op welk moment en op hoeveel monsters van hoeveel loten dienen de pH en a_w (wateractiviteit) gemeten te worden, wetende dat deze parameters evolueren naargelang de houdbaarheid van de kaas en hoeveel herhalingen dienen uitgevoerd te worden?
3. met betrekking tot de microbiologische analyses:
 - a. Op hoeveel monsters van hoeveel loten dienen de microbiologische analyses uitgevoerd te worden?
 - b. Waarvoor dienen andere microbiologische analyses zoals het totaal kiemgetal bij 22 °C, melkzuurflora, gisten, enz. en hoe dienen ze geïnterpreteerd te worden?
4. Welke zijn de aanbevelingen voor de bewaar temperatuur en -duur of andere factoren die belangrijk zijn om rekening mee te houden?
5. In welke mate kunnen de resultaten van de provocatietesten geëxtrapoleerd worden naar andere kazen van dezelfde soort dan wel andere soorten?

Vragen betreffende houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in kaas

1. In welke mate kan een houdbaarheidstest voor *Listeria monocytogenes* in kaas als alternatief voor een provocatietest dienen?

Indien een houdbaarheidstest als alternatief voor een provocatietest kan dienen, worden aan het Wetenschappelijk Comité de volgende vragen gesteld:

2. Op welk moment en op hoeveel monsters van hoeveel loten dienen de pH en a_w gemeten te worden, wetende dat deze parameters evolueren naargelang de houdbaarheid van de kaas en hoeveel herhalingen dienen uitgevoerd te worden?
3. Op hoeveel monsters van hoeveel loten dienen de microbiologische analyses uitgevoerd te worden?
4. Welke zijn de aanbevelingen voor de bewaartemperatuur en -duur of andere factoren die belangrijk zijn om rekening mee te houden?
5. met betrekking tot de interpretatie van het technisch richtsnoer:
 - a. Hoe dient de regel $n/N < 10\%$ geïnterpreteerd te worden en is een interpretatie van meer dan 10 monsters op een lot met 100 pakketten/eenheden juist?
 - b. Op welke manier dient de tabel met betrekking tot de p-waarden en betrouwbaarheidsintervallen geïnterpreteerd te worden en voor welke gevallen worden de risico's als zijnde laag dan wel hoog ingeschat?

1.2. Wettelijke context

- Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van de Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen
- Verordening (EU) Nr. 1169/2011 van het Europees Parlement en de Raad van 25 oktober 2011 betreffende de verstrekking van voedselinformatie aan consumenten, tot wijziging van Verordeningen (EG) nr. 1924/2006 van het Europees Parlement en de Raad en tot intrekking van Richtlijn 87/250/EEG van de Commissie, Richtlijn 90/496/EEG van de Raad, Richtlijn 1999/10/EG van de Commissie, Richtlijn 2000/13/EG van het Europees Parlement en de Raad, Richtlijnen 2002/67/EG van de Commissie, en Verordening (EG) nr. 608/2004 van de Commissie
- Koninklijk besluit van 13 juli 2014 betreffende levensmiddelenhygiëne

Overwegende de besprekingen tijdens de werkgroepvergaderingen van 22 oktober 2015 en 16 december 2015 en de plenaire zittingen van 18 december 2015, 29 januari 2016 en 19 februari 2016;

geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies:

2. Inleiding

Naar aanleiding van een terugroeping van rauwmelkse kaas door contaminatie met *Listeria monocytogenes*, heeft Minister Borsus beslist een begeleidingsstructuur voor kleine producenten op te richten binnen het FAVV. Wetenschappelijke ondersteuning is één van de pijlers van deze begeleiding. Op 25 juni 2015 vond een overleg plaats met de hoevezuivelsector. Er werd besloten om een adviesaanvraag in te dienen bij het

Wetenschappelijk Comité betreffende het uitvoeren van provocatietesten en houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in kaas.

In Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van de Europese Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen¹ worden o.a. microbiologische criteria vooropgesteld met betrekking tot kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor *Listeria monocytogenes* kunnen dienen (zie tabel 1).

Tabel 1. Voedselveiligheidscriteria voor *Listeria monocytogenes* volgens Verordening (EG) Nr. 2073/2005

Levensmiddelen-categorie	Bemonsterings-schema ^a		Grenswaarden ^b		Stadium waarvoor het criterium geldt
	n	c	m	M	
Kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor <i>L. monocytogenes</i> kunnen dienen, met uitzondering van zuigelingenvoeding en voeding voor medisch gebruik	5	0	100 kve/g ^c		Producten die in de handel zijn gebracht, voor de duur van de houdbaarheidstermijn
			Afwezig in 25 g ^d		Voordat het levensmiddel de directe controle van de exploitant van een levensmiddelenbedrijf die het geproduceerd heeft, heeft verlaten
Kant-en-klare levensmiddelen die niet als voedingsbodem voor <i>L. monocytogenes</i> kunnen dienen, met uitzondering van zuigelingenvoeding en voeding voor medisch gebruik ^e			100 kve/g		Producten die in de handel zijn gebracht, voor de duur van de houdbaarheidstermijn

^a n = aantal deelmonsters waaruit het monster bestaat; c = aantal deelmonsters met waarden tussen m en M.
^b De grenswaarden m en M zijn de waarden waartussen een bepaald aantal deelmonsters ('c') van het totaal aantal deelmonsters waaruit het monster bestaat ('n') mag liggen.
^c Dit criterium is van toepassing als de producent tot tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de grenswaarde van 100 kve/g zal voldoen. De exploitant kan intermediaire grenswaarden tijdens het proces vaststellen, die zo laag moeten zijn dat de grenswaarde van 100 kve/g aan het eind van de houdbaarheidstermijn niet wordt overschreven.
^d Dit criterium geldt voor producten voordat zij de directe controle van de exploitant van het levensmiddelenbedrijf die ze geproduceerd heeft, hebben verlaten, indien die exploitant niet tot tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de grenswaarde van 100 kve/g zal voldoen.
^e Producten met pH ≤ 4,4 of a_w ≤ 0,92, producten met pH ≤ 5,0 en a_w ≤ 0,94 en producten met een houdbaarheidstermijn korter dan vijf dagen worden zonder meer in deze categorie ingedeeld. Andere categorieën producten kunnen ook in deze categorie worden ingedeeld indien daar wetenschappelijke redenen voor zijn.

In diezelfde Verordening (EG) Nr. 2073/2005 wordt in artikel 3, lid 2 gesteld dat de voor de vervaardiging van het product verantwoordelijke exploitanten van levensmiddelenbedrijven voor zover nodig studies dienen te verrichten om na te gaan of gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de microbiologische criteria wordt voldaan. Dit geldt met name voor kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor *Listeria monocytogenes* kunnen dienen en die een risico voor de volksgezondheid kunnen inhouden. Er werd reeds vastgesteld in een eigen initiatief advies van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV

¹ <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20140601&qid=1447775099953&from=NL>

(SciCom, 2015) en in de internationale wetenschappelijke literatuur dat vooral zachte en halfharde kaas op basis van rauwe of gepasteuriseerde melk een risicoproduct is met betrekking tot *Listeria monocytogenes* (Lahou & Uyttendaele, 2015; R ckerl *et al.*, 2014; Schoder *et al.*, 2015; Verraes *et al.*, 2015).

Volgens bijlage II van de Verordening (EG) Nr. 2073/2005 dienen dergelijke studies de volgende zaken te omvatten:

- "specificaties betreffende de fysisch-chemische eigenschappen van het product, zoals pH, a_w , zoutgehalte, concentratie conserveermiddelen en aard van het verpakkingssysteem, met inachtneming van de opslag- en verwerkingsomstandigheden, de mogelijkheden van besmetting en de houdbaarheidstermijn, en
- raadpleging van de beschikbare wetenschappelijke literatuur en onderzoeksgegevens betreffende de groei- en overlevingseigenschappen van de betrokken micro-organismen.

Indien dit op grond van bovengenoemde studies nodig geacht wordt, verricht de exploitant van een levensmiddelenbedrijf aanvullende studies, zoals:

- ontwikkeling van wiskundige voorspellingsmodellen voor het desbetreffende levensmiddel met behulp van kritische groei- of overlevingsfactoren voor de relevante micro-organismen in het product;
- testen om na te gaan of het micro-organisme na inoculatie in het product kan groeien of daarin kan overleven onder uiteenlopende redelijkerwijs te verwachten opslagomstandigheden;
- studies ter evaluatie van de groei of overleving van de relevante micro-organismen die in het product aanwezig kunnen zijn gedurende de houdbaarheidstermijn onder redelijkerwijs te verwachten omstandigheden bij distributie, opslag en gebruik.

Bij bovengenoemde studies moet rekening gehouden worden met de inherente variabiliteit van het product, de desbetreffende micro-organismen (in dit geval: *Listeria monocytogenes*) en de verwerkings- en opslagomstandigheden."

Met het oog op het verschaffen van verdere verduidelijking voor de aanpak van dergelijke studies worden in een werkdocument van de diensten van de Europese Commissie ter informatie (niet door de Europese Commissie vastgesteld of goedgekeurd) richtsnoeren gegeven betreffende houdbaarheidstesten voor kant-en-klare levensmiddelen met betrekking tot *Listeria monocytogenes* in het kader van Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen². De voornaamste doelstelling van dit document is om exploitanten van levensmiddelenbedrijven die kant-en-klare levensmiddelen produceren, een leidraad te geven ten aanzien van hoe zij:

- naar tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kunnen aantonen dat de producten tot en met het einde van de houdbaarheidstermijn voldoen aan de EU-verordening;
- inzicht kunnen krijgen in het scala aan beschikbare benaderingen om te zorgen voor een veilige houdbaarheidstermijn met betrekking tot *Listeria monocytogenes*, en aldus de juiste benadering voor hun producten kunnen bepalen, en
- hun producten kunnen classificeren als kant-en-klare levensmiddelen waarin *Listeria monocytogenes* kan groeien of als kant-en-klare levensmiddelen waarin *Listeria monocytogenes* gedurende de houdbaarheidstermijn niet groeit.

Verder werd door het Europees referentielaboratorium voor *Listeria monocytogenes* (EURL *Lm*) in overleg met experts van diverse Nationale referentielaboratoria (NRL) het "EURL *Lm* technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food"³ (verder technisch richtsnoer genoemd) opgesteld. Dit is een richtlijn voor het uitvoeren van provocatietesten en houdbaarheidstesten. Voor wat betreft provocatietesten bestaan er twee types: een provocatietest om het groeipotentieel te bepalen en een provocatietest om de maximale groeisnelheid te bepalen. In dit advies worden enkel provocatietesten om het groeipotentieel te bepalen behandeld.

² http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/translation_guidance_lm_nl.pdf

³ http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/technical_guidance_listeria_en.pdf

Om tot een geharmoniseerde en correcte toepassing te komen van dit technisch richtsnoer in België, worden door het FAVV een aantal punten verduidelijkt in een dienstnota met als onderwerp: accreditatie van laboratoria voor de challenge test voor *Listeria monocytogenes* volgens het "Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to eat foods"⁴.

De Waalse organisatie DiversiFerm heeft als missie om producenten te begeleiden bij hun activiteiten van diversificatie en heeft aan het FAVV omtrent dit laatste document enkele specifieke vragen gesteld.

3. Methodologie

Vooreerst formuleert het Wetenschappelijk Comité enkele algemene opmerkingen bij de problematiek omtrent het risico van *Listeria monocytogenes* in kazen teneinde verduidelijking te verschaffen omtrent het doel van het technisch richtsnoer, de etikettering van kazen alsook de houdbaarheidstermijn van kazen. Vervolgens wordt een antwoord gegeven op de gestelde vragen (zie referentietermen). Deze antwoorden zijn gebaseerd op expertopinie, resultaten uit wetenschappelijke publicaties en informatie verzameld bij verschillende experts.

4. Algemene opmerkingen

4.1. Doel van het technisch richtsnoer

De beoordeling van het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* tijdens het productieproces van kaas is onderdeel van de validatie van het HACCP-plan van de producent en behoort niet tot de scope van het technisch richtsnoer.

Het technisch richtsnoer heeft als doelstelling om het groeipotentieel of de maximale groeisnelheid van *Listeria monocytogenes* te beoordelen tijdens de houdbaarheidstermijn van kant-en-klare producten die op de markt gebracht worden.

Het doel van provocatietesten is het inschatten of *Listeria monocytogenes* in staat is om te groeien en aantallen ≥ 100 kve/g te bereiken tijdens de vooropgestelde houdbaarheidstermijn of op de uiterste consumptiedatum, wanneer een initiële contaminatie van *Listeria monocytogenes* wordt vastgesteld na een bemonstering van 5 deelmonsters van een lot kaas waarbij één of meerdere monsters positief bevonden werd(en) per 25 gram product op dag 0 of tijdens de houdbaarheidstermijn nadat de producten op de markt gebracht zijn.

Het doel van houdbaarheidstest is om loten continu op te volgen enerzijds om te bepalen of een lot gecontamineerd is met *Listeria monocytogenes* of niet en anderzijds om te bepalen of het lot uitgroei van *Listeria monocytogenes* toelaat tot een aantal ≥ 100 kve/g op het einde van de houdbaarheidstermijn van het product.

4.2. Begin van houdbaarheidstermijn

In het kader van het bepalen van het moment van inoculatie van de kaas (zie punt 5.1.1.e.), worden in de volgende paragrafen de verantwoordelijkheden van producenten met betrekking tot de houdbaarheidstermijn verduidelijkt.

In het geval dat de kaas niet door één enkele producent geproduceerd wordt maar er opeenvolgend verschillende operatoren in de voedselketen betrokken zijn bij de verwerking, opslag en distributie, is het mogelijk dat er verwarring ontstaat over welke producent de verantwoordelijkheid draagt om de houdbaarheidstermijn (onder bepaalde bewaarcondities) te bepalen en wanneer de kaas klaar is om op de markt gebracht te worden. Dit kan van toepassing zijn wanneer een kaasproducent producten levert aan de groothandel of aan een kaaswinkel waar de kaas nog een verdere rijping (affinage) ondergaat. In dit geval dient er

⁴ http://www.afsca.be/laboratories/approvedlaboratories/officecircular/_documents/1238983_challenge-test_fr-nl_000.pdf

overleg te zijn tussen deze actoren in de voedselketen omtrent wie de houdbaarheidstermijn (en de bijhorende bewaarcondities) bepaalt en op welk moment de kaas klaar wordt geacht om op de markt te worden gebracht en de start (dag 0) van de houdbaarheidstermijn zich situeert.

Indien de houdbaarheidstermijn en de bijhorende bewaarcondities van de kaas worden vastgelegd door de producent en een volgende actor (vb. de kaasaffineur) in de voedselketen wijkt bewust af van deze bewaarvoorschriften, is het de verantwoordelijkheid van deze actor om de voedselveiligheid met betrekking tot *Listeria monocytogenes* te borgen voor de desbetreffende kaas tijdens de verdere opslag of affinage, alsook om de vooropgestelde verdere houdbaarheidstermijn en de bijhorende bewaarcondities aan te passen wanneer de kaas effectief in de distributie wordt gebracht.

5. Antwoorden op de gestelde vragen

5.1. Provocatietesten voor *Listeria monocytogenes* in kaas

5.1.1. Inoculatie

- a. Hoe kan een contaminatie van melk die gebruikt wordt voor de productie van de kaas gesimuleerd worden?

Contaminatiemogelijkheden van kaas met *Listeria monocytogenes*

Initiële contaminatie van kaas met *Listeria monocytogenes* kan afkomstig zijn van de (rauwe) melk die gebruikt werd voor de productie van de kaas, van de productieomgeving (apparatuur, gereedschap, infrastructuur, enz.) of van het personeel betrokken bij de productie, de rijping, de affinage, het versnijden en het verpakken van de kaas (in de distributie).

Inoculatie van melk

Een inoculatie van melk die gebruikt wordt voor de productie van de kaas is één van de mogelijkheden om een contaminatie van kaas met *Listeria monocytogenes* die afkomstig is van de (rauwe) melk te simuleren, zeker wanneer het rauwmelkse kazen betreft. Bij dergelijke proefopzet is de historiek van stress waaraan *Listeria monocytogenes* wordt blootgesteld tijdens het productieproces van kaas (verlaagde pH, verhoogd zoutgehalte, competitieve microbiota) maximaal aanwezig. Conform het technisch richtsnoer en de dienstnota van het FAVV, dient het initieel contaminatieniveau voor *Listeria monocytogenes* na de kaasproductie (en voor kazen met rijping na de kaasrijping) op dag 0 van de houdbaarheidstermijn (het tijdstip waarop de kaas klaar wordt geacht om op de markt gebracht te worden) ca. 100 kve per gram kaas te bedragen (zie punt 5.1.1.f.). Dit is belangrijk voor het bepalen en opvolgen van het groeipotentieel tijdens de houdbaarheidstermijn met het oog op harmonisatie van provocatietesten. Het is niet evident om bij de enting van de rauwe melk vóór het productieproces van de kaas een goed idee te hebben van het contaminatieniveau van *Listeria monocytogenes* na het productieproces van de kaas aangezien dit doorheen het productieproces van de kaas kan toenemen of afnemen. Dit is bijgevolg een omslachtig proces van *trial and error*. Dergelijke opzet van provocatietesten vereisen tevens het beschikken over pilootapparatuur om het industrieel proces te simuleren. Op pilotschaal kan, indien de faciliteiten het toelaten, gewerkt worden conform de bioveiligheidsvereisten die gepaard gaan met het werken met een humaan pathogene bacterie zoals *Listeria monocytogenes* welke tot bioveiligheidsklasse BL2 behoort. Indien een dergelijke proefopzet tot de mogelijkheden behoort en gecontroleerd kan worden uitgevoerd, dient dit bij voorkeur uitgevoerd te worden.

Inoculatie in de kaas

Een inoculatie in de kern van de kaas is een andere aanvaardbare mogelijkheid om het groeipotentieel te simuleren van *Listeria monocytogenes* afkomstig van rauwe melk. Dit kan uitgevoerd worden door na de kaasproductie *Listeria monocytogenes* te injecteren in de kern van de kaas waarbij een initieel contaminatieniveau voor *Listeria monocytogenes* van ca. 100 kve per gram kaas op dag 0 van de houdbaarheidstermijn bereikt dient te worden, conform het technisch richtsnoer (zie punt 5.1.1.f.).

- b. Hoe dient de inoculatie uitgevoerd te worden (in de kern of op het oppervlak; per type kaas; welke methode)?

Zoals vermeld in punt 5.1.1.a., kan *Listeria monocytogenes* kaas contamineren via verschillende contaminatieroutes. Bijgevolg zijn de verschillende mogelijke manieren van artificiële inoculatie van *Listeria monocytogenes* afhankelijk van de meest waarschijnlijke contaminatieroute welke afhankelijk is van het type kaas, de fysisch-chemische eigenschappen, het productieproces van de kaas en de beschikbare informatie uit de wetenschappelijke literatuur (zie studies vermeld in bijlage II van de Verordening (EG) Nr. 2073/2005). De manier van inoculatie zal ook gedeeltelijk bepaald worden door de vragende partij voor provocatietesten, vb. de producent die de houdbaarheidstermijn en de bijhorende bewaarcondities van een (intacte, niet versneden) kaas(bol) bepaalt na de productie, de afnemer die het effect van een nabesmetting en de invloed hiervan op de houdbaarheidstermijn na verdere rijping van de kaas wil onderzoeken, de kaasgroothandel of winkel(keten) die een langdurige tussentijdse bewaring van versneden kaas wil onderzoeken, enz. Net zoals in andere levensmiddelensectoren is het uitwerken van de proefopzet, welke gebeurt binnen de randvoorwaarden geschetst door het technisch richtsnoer, aan variatie onderhevig afhankelijk van de precieze vraagstelling of doelstelling van de opdrachtgever.

Zoals bovenvermeld, kan een artificiële inoculatie uitgevoerd worden in de kern van de kaas. Dergelijke inoculatie kan uitgevoerd worden indien een contaminatie vanuit de rauwe melk of tijdens het beginstadium van de productie vanuit de productieomgeving of het personeel (vb. tijdens het persen van de wrongel of pekelen) het meest waarschijnlijk wordt geacht. Een inoculatie in de kern kan mogelijks uitgevoerd worden d.m.v. een injectie in de kaas (vb. in kleine kaasbolletjes of in grote kazen). Met het oog op een goede monitoring van het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* in het laboratorium, het beschikken over analyseresultaten met telbare aantallen en de kans op het terugvinden van *Listeria monocytogenes* in een testeenheid wanneer dit een submonster is van een grotere testeenheid die initieel geïnoculeerd werd, dient een zo goed mogelijk verspreide en zo homogeen mogelijke inoculatie van *Listeria monocytogenes* in de kaas verkregen te worden. Dit is vooral belangrijk voor grote kazen van vb. 10 kg, waar de redoxpotentiaal in de kern verschilt van deze dicht bij de rand van de kaas. Ook het zoutgehalte aan de rand is meestal hoger dan in de kern door beperking van zoutdiffusie tijdens het pekelp proces. Bijgevolg dient de injectie tot zo ver mogelijk in de kern en zo verspreid mogelijk in de kaas uitgevoerd te worden. Conform het technisch richtsnoer wordt er gestreefd naar een initieel contaminatieniveau van *Listeria monocytogenes* van ca. 100 kve per gram kaas. Gezien er standaard in het laboratorium een submonster van ca. 30 gram wordt genomen voor het uitvoeren van een telling van *Listeria monocytogenes* in het laboratorium en gezien deze 30 gram een submonster is van een grotere individuele kaas(bol) (vb. 200 tot 500 gram) die initieel gecontamineerd werd en bewaard werd in het laboratorium onder vooropgestelde bewaarcondities, zal de inoculatie als volgt verlopen. Stel dat men bij een kaas(bol) van 250 gram een initiële contaminatie van ca. 100 kve/g beoogt. Dit betekent dat het totaal inoculum in de kaasbol 25.000 kve dient te bedragen (100 kve/g x 250 g). Hierbij mag het volume van het inoculum niet meer dan 1 % van het volume van de kaas bedragen. Voor de kaasbol van 250 gram mag het inoculum dus niet meer dan 2,5 mL bedragen, maar wel vb. 0,5 mL (= 0,2 % gewichtseenheid). In dit geval kan een opkweek van een cocktail van *Listeria monocytogenes* stammen (de voorwaarden voor de opkweek, de keuze van de stammen en het maken van de cocktail zijn beschreven in het technisch richtsnoer) verdund worden tot ca. 50.000 kve/mL en hiervan kan dan via 10 injecties met ca. 2.500 kve elk in 50 µL en verspreid in de kaas worden teneinde een zo homogeen mogelijke verspreiding van het inoculum te bekomen. Dit rekvoorbeeld toont aan hoe kan omgegaan worden met de vereisten van het

technisch richtsnoer voor een bepaald kaasgewicht dat onderzocht wordt met simulatie van een contaminatie in de kern.

Echter, contaminatie met *Listeria monocytogenes* kan ook optreden aan de oppervlakte van de kaas door een nabesmetting (voornamelijk tijdens de verdere stadia in het productieproces vanuit vb. de kaasvorm, de rekken gebruikt voor de kaasrijping, het versnijden van de kaas, enz.). Bovendien is het oppervlak van sommige kazen een gunstigere omgeving voor groei van *Listeria monocytogenes* door een verhoging van de pH, voornamelijk door de tussenkomst van gisten. Voor het simuleren van een dergelijke contaminatie is het aan te bevelen om een inoculatie uit te voeren op het oppervlak van de kaas of op het snijvlak van de kaas. De inoculatie op de totale oppervlakte van de kaas(bol) dient om een nabesmetting van de afgewerkte kaas te simuleren. De inoculatie op het snijvlak van de kaas dient om een nabesmetting ten gevolge van het versnijden van afgewerkte kaas (vb. bij grote kazen) te simuleren. Teneinde problemen met de monsternamen te voorkomen en voldoende betrouwbare resultaten te bekomen, kan dergelijke inoculatie uitgevoerd worden d.m.v. het verspreiden van het inoculum over het oppervlak of het snijvlak van de kaas. Stel dat men bij een kaas(bol) van 250 gram een initieel inoculum van ca. 100 kve/g beoogt. Dit betekent dat het totaal inoculum op de kaasbol 25.000 kve dient te bedragen (100 kve/g x 250 g). Hierbij mag het volume van het inoculum niet meer dan 1 % van het volume van de kaas bedragen. Voor de kaasbol van 250 gram mag het inoculum dus niet meer dan 2,5 mL bedragen, maar wel vb. 0,5 mL (= 0,2 % gewichtseenheid). In dit geval kan een opkweek van een cocktail van *Listeria monocytogenes* stammen verdund worden tot ca. 50.000 kve/mL en vervolgens kan dan het inoculum van 0,5 mL volledig verspreid (vb. opengespateld) worden over het oppervlak of het snijvlak van de kaas teneinde een voldoende homogeniteit van de inoculatie te bekomen. De bemonstering van het oppervlak dient gestandaardiseerd te worden aangezien op dit oppervlak groei wordt verwacht. Om te voldoen aan de vereisten in het technisch richtsnoer dient zoals bovenvermeld een berekening uitgevoerd te worden met betrekking tot de volumes en de concentraties van het inoculum dat dient aangebracht te worden.

Ook bij gasverpakte of vacuümverpakte producten is het belangrijk dat het inoculum over het volledige kaasoppervlak wordt verspreid, aangezien de zoutconcentratie verschillend kan zijn tussen het midden en het kaasoppervlak. Bij (her)verpakking van de kaas dient rekening gehouden te worden met de representatieve gas/product-verhouding en de initiële gassamenstelling van de voorverpakte kaas.

- c. Verandert een injectie de intrinsieke eigenschappen van de kaas ter hoogte van de injectiezones?

In principe kunnen de inoculum volumes inderdaad de intrinsieke eigenschappen ter hoogte van de injectiezones of inoculatiezones wijzigen. Bijgevolg is in het technisch richtsnoer een beperking gesteld aan de verhouding van inoculum en product welke niet hoger dan 1 % van de massa (of het volume) van de testeenheid mag zijn.

Bovendien is het mogelijk om de waarde van de pH en/of a_w aan te passen in overeenstemming met de gemeten waarden in het product. Dit is mogelijk belangrijk wanneer het een kaas betreft met intrinsieke eigenschappen die zich op de grens van groei of geen groei van *Listeria monocytogenes* bevinden. Deze aanpassing kan door het inoculum te verdunnen in gebufferd peptonwater (BPW) met een aangepaste pH en meer zout tot het BPW een pH en a_w heeft die overeenkomt met de gemeten pH en a_w van de kaas in kwestie. Deze aanpassing van pH en a_w van het inoculum wordt echter niet geëist in het technisch richtsnoer, maar volgens het Wetenschappelijk Comité dient dit toegepast te worden indien het relevant wordt geacht.

- d. Welke contaminatiemogelijkheden dienen gesimuleerd te worden (contaminatie van de melk, contaminatie tijdens of na de productie van de kaas, enz.)?

Zoals vermeld in punt 5.1.1.a., kan *Listeria monocytogenes* kaas contamineren via verschillende routes. Afhankelijk van het geval, is het mogelijk dat de twee verschillende types van inoculatie van de kaas met *Listeria monocytogenes* (zoals vermeld in punt 5.1.1.b.) afzonderlijk gesimuleerd dienen te worden, nl. één provocatietest met inoculatie via injectie in de kern van de kaas en een tweede provocatietest met inoculatie op het oppervlak van de kaas.

Zoals vermeld in punt 5.1.1.b., wordt de manier van inoculatie gedeeltelijk bepaald door de vragende partij voor provocatietesten. Het is belangrijk dat de keuze van het type inoculatie gemotiveerd wordt door de aanvrager in functie van het type kaas, de voorziene of gedocumenteerde contaminatiemogelijkheden en de doelstelling van de provocatietest.

Wanneer bijvoorbeeld de producent over voldoende analyseresultaten of andere gegevens beschikt die aantonen dat contaminatie met *Listeria monocytogenes* vanuit de productieomgeving weinig waarschijnlijk is (in de meeste gevallen zal dit echter niet met zekerheid geweten zijn) en dus enkel wanneer men vermoedt dat een contaminatie zich in de kern bevindt, is een provocatietest met enkel een inoculatie in de kern van de kaas nodig.

Wanneer de producent daarentegen over voldoende analyseresultaten of andere gegevens beschikt die aantonen dat contaminatie met *Listeria monocytogenes* vanuit de (rauwe) melk weinig waarschijnlijk is, is een provocatietest met enkel een inoculatie op het (snij)oppervlak van de kaas nodig.

Er wordt aanbevolen om de inoculatie en de bemonstering zowel in de kern als op het (snij)oppervlak van de kaas uit te voeren, wanneer er onvoldoende informatie beschikbaar is over de contaminatieroutes van *Listeria monocytogenes*. Het uitvoeren van twee afzonderlijke provocatietesten (één waarbij in de kern geïnoculeerd wordt en één waarbij op het (snij)oppervlak geïnoculeerd wordt) geeft meer informatie en kennis over waar effectief groei optreedt en waar het hoogste groeipotentieel zich situeert voor de kaas. Het uitvoeren van twee afzonderlijke provocatietesten is echter niet noodzakelijk en de testen kunnen gecombineerd worden. Hierbij wordt dan in éénzelfde provocatietest dezelfde portie kaas in de kern en op het (snij)oppervlak geïnoculeerd. Het hoogste groeipotentieel zal dan domineren in het resultaat van deze provocatietest. In dit geval dient het totale eindvolume van het inoculum verdeeld te worden over beide inoculumplaatsen (de helft voor injectie in de kern en de andere helft voor de oppervlaktebeënting). Stel dat men bij een kaas(bol) van 250 gram een initieel inoculum van ca. 100 kve/g beoogt. Dit betekent dat het totaal inoculum op de kaasbol 25.000 kve dient te bedragen (100 kve/g x 250 g). Hierbij mag het volume van het inoculum niet meer dan 1 % van het volume van de kaas bedragen. Voor de kaasbol van 250 gram mag het inoculum dus niet meer dan 2,5 mL bedragen, maar wel vb. 1 mL (= 0,4 % gewichtseenheid). In dit geval kan een opweek van een cocktail van *Listeria monocytogenes* stammen verdund worden tot ca. 25.000 kve/mL. Vervolgens wordt de injectie uitgevoerd via 10 injecties van ca. 1.250 kve elk in 50 µL, verspreid in de kaas, en de andere 0,5 mL kan dan verspreid worden over het oppervlak of het snijvlak van de kaas teneinde een voldoende homogeniteit van de inoculatie te bekomen.

- e. In welk stadium van de productie van de kaas dient de inoculatie te gebeuren (vóór of na de rijping)?

In deze paragraaf wordt het geval van de inoculatie van de melk voor de kaasbereiding buiten beschouwing gelaten.

De inoculatie van de kaas dient uitgevoerd te worden na de rijping van de kaas op de eerste dag van de houdbaarheidstermijn (dag 0), m.a.w. het moment dat de kaas als kant-en-klaar levensmiddel op de markt wordt gebracht en eventueel een etiket heeft met de aanbevolen bewaarcondities.

De verantwoordelijkheid voor de veiligheid van de producten ligt bij de producenten zelf. Bijgevolg dient de keuze van het moment van inoculatie geargumenteed te worden door de producent(en) die verantwoordelijk is (zijn) voor het vastleggen van de houdbaarheidsstermijn van de kaas (zie punt 4.2.).

- f. Kan een initieel contaminatieniveau van 10 kve/g gehanteerd worden om een meer realistische situatie na te bootsen?

Bij een lager initieel contaminatieniveau kan het effect van de variabiliteit van de lagfase⁵ van de individuele cellen een rol spelen (Francois *et al.*, 2006). Immers, sommige cellen zullen een kortere en andere cellen een langere lagfase hebben waardoor er meer herhalingen van de proef nodig zijn om tot een betrouwbaar resultaat te komen met betrekking tot de inschatting van het groeipotentieel teneinde deze variabiliteit te compenseren. Volgens Francois *et al.* (2006) dienen minimum 1.000 cellen aangebracht te worden per te bemonsteren portiegrootte om de variabiliteit van de individuele cellen te minimaliseren. Wanneer een monster van 100 gram beënt wordt, is het in principe mogelijk om te werken met een initieel contaminatieniveau van 10 kve/g. Het Wetenschappelijk Comité beveelt echter aan om een initieel contaminatieniveau van 100 kve/g na te streven, zoals ook aanbevolen in het technisch richtsnoer, ook omdat de telling van *Listeria monocytogenes* onvoldoende nauwkeurig kan uitgevoerd worden bij aantallen minder dan 100 kve/g.

Bij een te hoog initieel contaminatieniveau kan de pathogeen mogelijks een te dominante positie innemen, waardoor interferentie kan optreden met de van nature aanwezige begeleidende microbiota in de kaas, waardoor de bekomen resultaten niet meer relevant zijn.

In het technisch richtsnoer werd bijgevolg het vereiste initieel contaminatieniveau vastgelegd op ca. 100 kve/g. In de dienstnota van het FAVV wordt een marge van 50 kve/g toegestaan voor dit initieel contaminatieniveau en bijgevolg mag de concentratie van het inoculum tussen 50 en 150 kve/g bedragen. Echter, bij het tellen van lage aantallen is gekend dat de meetonzekerheid van een telmethode ca. een factor 3 bedraagt wanneer het analyseresultaat wordt uitgedrukt in absolute aantallen. Dit betekent dat een meetresultaat van ca. 100 kve/g zich bij een duplo-analyse mogelijks zal situeren tussen ca. 30 kve/g en 300 kve/g. Een vastgelegd, na te streven inoculatie-niveau van 100 kve/g impliceert dus al een marge.

- g. Wetende dat het initieel contaminatieniveau de factor is die het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* het meest beïnvloedt, wordt gevraagd of een groeipotentieel groter dan 0,5 log-eenheden gelijk is bij een initieel contaminatieniveau van 100 kve/g en bij een initieel contaminatieniveau van 10 kve/g?

Het groeipotentieel wordt bepaald door de lagfase en de groeisnelheid. Het initieel contaminatieniveau heeft invloed op de geobserveerde lagfase maar niet op de geobserveerde groeisnelheid. Die invloed is enkel relevant wanneer het initieel contaminatieniveau lage aantallen betreft zoals bovenvermeld en niet voor een initieel contaminatieniveau zoals aanbevolen in het technisch richtsnoer (100 kve/g). Voor dergelijke relatief hoge contaminatieniveaus (van 100 kve/g) mag verondersteld worden dat er steeds minstens enkele cellen aanwezig zullen zijn die delen aan de snelheid horend bij de fysisch-chemische condities (temperatuur, pH, enz.) en dus als snelst delende cellen optreden. Bij lage contaminatieniveaus is het mogelijk dat er toevallig geen sneller delende cellen aanwezig zijn en dus een cel met lagere snelheid van deling de geobserveerde lagfase en vervolgens de groeisnelheid zal bepalen. Er mag daarom verwacht worden dat het geobserveerde groeipotentieel vertrekkend van hogere celtaantallen eerder een kleine (maar ongekende) overschatting zal zijn van het groeipotentieel vertrekkend van lagere aantallen. Dit werd aangetoond in een publicatie van Francois *et al.* (2006) bij het vergelijken van de uitgroei van contaminatieniveaus van 10 tot 10.000 cellen per 15 gram paté. Østergaard *et al.* (2015) gebruikten een andere aanpak (het RLT of *Relative Lag Time concept* voor individuele

⁵ Tijdens de **lagfase** passen bacteriën zich aan aan de groeiomstandigheden. Dit is de periode waarin de individuele bacteriën groeien en nog niet in staat zijn om zich te vermenigvuldigen. Afhankelijk van de voorafgaande stress die de bacteriën ondervonden hebben, zal de lagfase langer of korter duren.

Listeria monocytogenes cellen) en vonden een goede overeenkomst tussen hun modelvoorspelling en de testresultaten bij een initieel contaminatieniveau zo laag als 0,4 - 1 kve/g in *cottage cheese*.

Samengevat wordt op basis van de huidige kennis een geschat groeipotentieel groter dan 0,5 log-eenheden, bij een initieel contaminatieniveau van 100 kve/g niet als significant verschillend beschouwd ten opzichte van een te verwachten groeipotentieel bij een initieel contaminatieniveau van 10 kve/g.

De groeisnelheid van *Listeria monocytogenes* in levensmiddelen wordt beïnvloed door de intrinsieke eigenschappen van het product (pH, a_w , zoutgehalte), de bewaartemperatuur, de verpakingsatmosfeer, het aantal en de samenstelling van de begeleidende microbiota (o.a. melkzuurbacteriën) en de *Listeria monocytogenes* stam. Daarom werd in het technisch richtsnoer gesteld dat een goede beschrijving van de intrinsieke eigenschappen van het product nodig is, dat de bewaaromstandigheden van het product vastgelegd dienen te worden, dat voor de cocktail goed gekarakteriseerde *Listeria monocytogenes* stammen dienen gebruikt te worden voor inoculatie welke op een gestandaardiseerde wijze dienen opgegroeid te worden en dat aanbevolen wordt om de provocatietest uit te voeren op drie verschillende loten van eenzelfde type product teneinde de variabiliteit in de producteigenschappen in rekening te brengen bij het bepalen van de groeipotentieel.

- h. Kan een groeipotentieel groter dan 0,5 log-eenheden gebruikt worden voor het bepalen van de finale houdbaarheidstermijn van *Listeria monocytogenes* en voor het bepalen van een intermediaire limietwaarde waarbij het criterium van 100 kve/g gerespecteerd wordt?

Indien het groeipotentieel bepaald wordt zoals voorgeschreven in het technisch richtsnoer, kan dit groeipotentieel gebruikt worden voor het bepalen van een intermediaire limietwaarde op de eerste dag van de houdbaarheidstermijn (het moment dat het product klaar is om op de markt gebracht te worden). Er wordt aan de laboratoria gevraagd om tabel 2 te gebruiken voor de interpretatie van het resultaat voor het groeipotentieel dat wordt verkregen tijdens een volgens het technisch richtsnoer uitgevoerde provocatietest, zodat er rekening wordt gehouden met de meetonzekerheid (zie dienstnota FAVV).

Tabel 2. Tolerantiewaarden van *Listeria monocytogenes* op dag 0 op basis van het groeipotentieel van een provocatietest uitgevoerd volgens het technisch richtsnoer

δ berekend volgens het Europese protocol	Tolerantiewaarde op "dag 0" (microbiologisch criterium)
Tussen -1,00 en 0,00	< 100/g
Tussen 0,00 et 0,49	< 100/g
Tussen 0,50 et 0,99	Afwezig in 0,1 g
Tussen 1,00 et 1,99	Afwezig in 1 g
Tussen 2,00 et 2,99	Afwezig in 10 g
> 2,99	Afwezig in 25 g

Dit groeipotentieel kan echter niet gebruikt worden voor het bepalen van de finale houdbaarheidstermijn aangezien men vóór de start van de provocatietest reeds een houdbaarheidstermijn heeft bepaald. Indien men toch een finale houdbaarheidstermijn wenst te bepalen, dient men provocatietesten uit te voeren waarbij men de maximale groeisnelheid bepaalt (zie punt 3.2.2 in het technisch richtsnoer). Op basis van de resultaten van dergelijke testen kan men dan een te verwachten houdbaarheidstermijn bepalen waarbij het criterium van 100 kve/g gerespecteerd wordt bij een gegeven initieel contaminatieniveau.

- i. Kunnen provocatietesten met *Listeria innocua* geaccepteerd worden en indien ja, waar dient deze stam gehaald te worden?

Provocatietesten dienen bij voorkeur uitgevoerd te worden met goed gekarakteriseerde stammen van *Listeria monocytogenes* zoals voorgeschreven in het technisch richtsnoer en niet met *Listeria innocua*. Op pilotschaal kunnen proeven met *Listeria innocua* als surrogaatstam voor *Listeria monocytogenes* uitgevoerd worden waarbij ook het productieproces wordt gevalideerd (zie punt 4.1.) voorafgaand aan de eigenlijke provocatietest ter beoordeling van het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* tijdens de houdbaarheidstermijn. Wanneer men opteert voor *Listeria innocua*, dienen deze stammen voldoende gekarakteriseerd te worden en dient aangetoond te worden dat deze *Listeria innocua* stammen gelijkaardige groeikarakteristieken hebben als *Listeria monocytogenes*. Echter, het gebruik van *Listeria monocytogenes* stemt beter overeen met de werkelijke situatie.

5.1.2. Metingen van pH en a_w

Op welk moment en op hoeveel monsters van hoeveel loten dienen de pH en a_w gemeten te worden, wetende dat deze parameters evolueren naargelang de houdbaarheid van de kaas en hoeveel herhalingen dienen uitgevoerd te worden?

Vooraf tijdens de rijping van de kaas kunnen de pH en a_w significant wijzigen. Volgens het technisch richtsnoer dient de inoculatie uitgevoerd te worden na de rijping van de kaas op het moment dat de producent de kaas klaar acht om op de markt te worden gebracht. Na de rijping wordt een minder sterke evolutie van de pH en a_w verwacht. Echter, de pH en a_w kunnen variëren tussen verschillende loten van eenzelfde type kaas en vooral tussen de verschillende delen van de kaas, de kern, het oppervlak, de randen of de hoeken van de kaas (Lahou & Uyttendaele, 2015). Vandaar dat in het technisch richtsnoer wordt aanbevolen om de pH en a_w te meten op dag 0 (eerste dag van de provocatietest) en op het voorziene einde van de houdbaarheidstermijn (laatste dag van de provocatietest). Deze metingen dienen eenmaal op één testeenheid per lot te gebeuren zowel op dag 0 als op de laatste dag van de houdbaarheidstermijn. Dit dient te gebeuren in de kern en/of op het oppervlak van de kaas, overeenkomstig de plaats van inoculatie. Voor de metingen van de pH en de a_w kan men gebruik maken van ISO-methoden. Voor de pH kan men gebruik maken van de ISO 2917:1999 ("Meat and meat products - Measurement of pH - Reference method") en voor de a_w kan men gebruik maken van de ISO 21807:2004 ("Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Determination of water activity" – confirmed in 2014). Gezien de beperking in het huidige toepassingsgebied is het aanbevolen om de ISO-methode voor de meting van de pH te evalueren met het oog op de toepassing voor zuivelproducten. Ook is het aanbevolen dat de horizontale ISO-methode voor de meting van de a_w voldoende geverifieerd wordt in zijn performantie specifiek voor de meting van de a_w in zuivelproducten.

Daarnaast beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om op dezelfde momenten het zoutgehalte en de droge stof te bepalen teneinde het type kaas te karakteriseren. Andere visuele kenmerken kunnen eveneens opgevolgd worden (vb.: witschimmel kaas, barsten in korst, afwijkende geuren, smeugheid, enz.).

5.1.3. Microbiologische analyses

- a. Op hoeveel monsters van hoeveel loten dienen de microbiologische analyses uitgevoerd te worden?

In het technisch richtsnoer staat vermeld dat tellingen en detecties van *Listeria monocytogenes* dienen uitgevoerd te worden op dag 0 (de eerste dag van de houdbaarheidstermijn, m.a.w. het marktklaar zijn van het product) en op de laatste dag van de houdbaarheidstermijn zoals bepaald door de verantwoordelijke producent(en) op drie testeenheden per lot. Het aantal te testen loten dient bepaald te worden op basis van een groei/geen groei-grensmodule of op basis van een calculator die de variabiliteit tussen loten berekent (zie punt a. in punt 3.2.1.2 van het technisch richtsnoer).

- b. Waarvoor dienen andere microbiologische analyses zoals het totaal kiemgetal bij 22 °C, melkzuurflora, gisten, enz. en hoe dienen ze geïnterpreteerd te worden?

Een telling van het totaal kiemgetal bij 22 °C is niet relevant voor kazen. Kaas is een gefermenteerd product waarbij steeds een hoog totaal kiemgetal te verwachten is ten gevolge van de aanwezigheid van hoge aantallen melkzuurbacteriën die ofwel toegevoegd werden als startercultuur ofwel als natuurlijk ferment aanwezig zijn. Bij zachte, halfzachte en halfharde kazen ligt het aantal melkzuurbacteriën in de grootte-orde van 5 tot 9 log kve/g (Lahou & Uyttendaele, 2015). Mogelijks kan een uitgroei van melkzuurbacteriën als onderdeel van de begeleidende microbiota tot hoge aantallen het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* beperken (Montel *et al.*, 2014; Ross *et al.*, 2000).

Het bepalen van gisten en schimmels is niet relevant voor kazen. Schimmels kunnen visueel beoordeeld worden. Bij schimmelkazen is hun aanwezigheid normaal, maar bij andere kazen kunnen ze wijzen op bederf.

De bepaling van *E. coli* en coagulase-positieve stafylokokken kan interessant zijn om een inschatting te maken over de algemene microbiologische kwaliteit van het type kaas en het desbetreffende lot maar deze parameters interfereren niet met de groei van *Listeria monocytogenes*.

5.1.4. Bewaar temperatuur en -duur

Welke zijn de aanbevelingen voor de bewaar duur en -temperatuur of andere factoren die belangrijk zijn om rekening mee te houden?

De aanbevelingen voor de bewaar duur en -temperatuur worden weergegeven in tabel 3 (zie tabel 3 in technisch richtsnoer).

Tabel 3. Flow diagram van bewaar(incubatie)condities

Stage of cold chain	Storage (incubation) temperature			Storage (incubation) duration			
				Shelf life ≤ 21 days		Shelf life > 21 days	
From the manufacture until the arrival to the display cabinet	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	8°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	7 days
Retail: Display cabinet	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	12°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	½ (shelf life – 7 days)
Consumer storage	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	12°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	½ (shelf life – 7 days)

* Temperature justified by detailed information: the 75th percentile of the observations for the country where the stage of the cold chain is located.

Zoals te zien is in tabel 3, bestaan er voor wat betreft de bewaar duur- en temperatuur van provocatietesten, drie stadia waarmee men rekening dient te houden.

Op het stadium van de producent tot aan de aankomst in de detailhandel dient de keuze van de temperatuur en duur gemotiveerd te worden door de producent of indien informatie ontbreekt dient de temperatuur 8 °C te bedragen en de duur een derde van de totale houdbaarheidstermijn indien deze ≤ 21 dagen bedraagt of 7 dagen indien totale houdbaarheidstermijn > 21 dagen bedraagt.

Op het stadium van de toonbank in de detailhandel dient de keuze van de temperatuur en duur gemotiveerd te worden door de producent of indien informatie ontbreekt dient de temperatuur 12 °C te bedragen en de duur een derde van de totale houdbaarheidstermijn indien deze ≤ 21 dagen bedraagt of de helft van de totale houdbaarheidstermijn – 7 dagen indien deze > 21 dagen bedraagt.

Op het stadium van bewaring bij de consument dient de keuze van de temperatuur en duur gemotiveerd te worden door de producent of indien informatie ontbreekt dient de temperatuur 12 °C te bedragen en de duur een derde van de totale houdbaarheidstermijn indien deze ≤ 21 dagen bedraagt of de helft van de totale houdbaarheidstermijn – 7 dagen indien deze > 21 dagen bedraagt. Volgens het technisch richtsnoer en volgens diverse opinies van EFSA, houdt het 75^{ste} percentiel van het aantal observaties van de temperaturen van huishoudelijke koelkasten in een bepaald land voldoende rekening met temperatuursmisbruik tijdens bewaring bij de consument.

Voor wat betreft de Belgische situatie, bedraagt de wettelijke bewaar temperatuur in de detailhandel, zoals vermeld in het koninklijk besluit van 13 juli 2014 betreffende levensmiddelenhygiëne, ≤ 7 °C⁶. In bijlage 1 wordt het percentage non-conformiteiten van inspecties met betrekking tot “temperaturen gekoelde levensmiddelen en diepvriesproducten worden gerespecteerd” in de sector distributie voor de periode 2013-2015 weergegeven. Een non-conformiteit betekent dat de gemeten temperatuur in het product hoger was dan de wettelijk vereiste temperatuur of dat het product niet in koeling bewaard werd terwijl dit wettelijk wel vereist was. Uit bijlage 1 blijkt dat 8,67 % op 64.744 controles niet conform was. Aangezien het percentage conformiteiten meer dan 90 % bedraagt, kan de bewaar temperatuur van 7 °C voor kaas in de detailhandel gerechtvaardigd worden voor gebruik in provocatietesten.

Voor wat betreft de bewaar temperatuur bij de consument, kan men volgens de dienstnota van het FAVV gebruik maken van een bewaar temperatuur van 7 °C. Deze temperatuur betreft het 75^{ste} percentiel van het aantal observaties van de temperatuur in huishoudelijke koelkasten in België, welke gemeten werden in het kader van de voedselconsumptiepeiling in 2004 uitgevoerd door het WIV⁷. In een rapport van het WIV⁸ wordt echter gesteld dat de gemiddelde koelkasttemperatuur 7,2 °C is met een interkwartielafstand van 5 °C tot 9 °C. Dit betekent dat het 75^{ste} percentiel 9 °C bedraagt.

5.1.5. Extrapolatie van resultaten

In welke mate kunnen de resultaten van de provocatietesten geëxtrapoleerd worden naar andere kazen van dezelfde soort dan wel andere soorten?

In het richtsnoer van de Europese Commissie wordt het volgende vermeld:

- “De studies voor de producten zijn alleen geldig als de producten dezelfde eigenschappen hebben (pH, a_w , zoutgehalte, concentratie van conserveermiddelen, soort verpakking, bijbehorende microbiologische flora of overige eigenschappen die van belang zijn voor de overleving of groei van *L. monocytogenes*). Als een of meer eigenschappen verschillen, kunnen de studies niet worden gebruikt zonder het effect van de verschillende eigenschappen op de overleving en groei van *L. monocytogenes* te beoordelen.

⁶

http://www.warenwetgeving.be/modules/search_div.phtml?id_parent=72&id=145&type=d&start=0&maxlines=10&fulltextmode=title&showAbolished=nee

⁷ <https://www.wiv-isp.be/epidemiologie/foodnl/table04.htm>

⁸ <https://www.wiv-isp.be/epidemiologie/foodnl/food04nl/foodsynl.pdf>

- Het recept voor het product moet hetzelfde zijn. Indien dit niet het geval is, moeten de ingrediënten worden beoordeeld op hun effect op de groei van *L. monocytogenes*.
- Het productieproces van de producten moet vergelijkbaar zijn. De processtappen moeten in detail worden vergeleken en het effect van eventuele verschillen in de processen op de overleving en groei moet worden beoordeeld. De studies dienen rekening te houden met de variabiliteit die inherent is aan het product.
- De opslagomstandigheden en de houdbaarheidstermijn moeten vergelijkbaar zijn. Indien dit niet het geval is, moeten de verschillen worden beoordeeld op hun effect op de groei van *L. monocytogenes*.
- Bijbehorende microbiologische flora (fermenten) moeten identiek zijn en, zo niet, hetzelfde effect hebben op *L. monocytogenes*.”

Uit wetenschappelijk onderzoek blijkt dat er een grote variabiliteit bestaat omtrent het gedrag van *Listeria monocytogenes* zowel tussen diverse types zachte en halfharde kazen als binnen diverse loten van eenzelfde type kaas (Lahou & Uyttendaele, 2015). De classificatie van kazen (en vooral zachte en halfharde kazen) in bepaalde types met een gelijkaardig te verwachten groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* is niet gemakkelijk. Er is namelijk een hoge variabiliteit in de parameters die het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* beïnvloeden. Dit komt omdat kazen gefermenteerde producten zijn en minder te standaardiseren of onder controle te houden zijn qua eigenschappen dan andere producten met een verlengde houdbaarheid die gekoeld bewaard worden zoals vb. gekookte vleeswaren, spreads, gerookte vis, enz.

De intrinsieke parameters die het meest relevant zijn voor het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* zijn de pH, de a_w (houdt onder andere verband met het zoutgehalte), het vochtgehalte, de aard en de aantallen van de nevenflora intern en op de korst (zowel geënt als niet geënt als startercultuur (competitie voor nutriënten, antimicrobiële componenten, enz.)), de aard van de melk (oorsprong, hittebehandeling, enz.) en de textuur van de kaas. Deze finale karakteristieke parameters ontstaan als gevolg van het productieproces inclusief de rijping van de kaas. De extrinsieke parameters die het meest relevant zijn voor het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* tijdens de rijping en de bewaring van de kaas zijn de temperatuur, de relatieve luchtvochtigheid en de gassamenstelling binnen de verpakking.

Kazen kunnen op verschillende manieren worden ingedeeld. De Codex Alimentarius Commission hanteert in eerste instantie een aanduiding van de kaas op basis van de hardheid, vervolgens op basis van het vetgehalte en ten slotte op basis van de rijpingskarakteristieken (zie bijlage 2). In dit kader lijkt de meest relevante indeling deze op basis van de technologie van de bereiding en rijping, welke resulteert in diverse intrinsieke eigenschappen van de kaas (waaronder in eerste instantie de indeling op basis van de consistentie van de kaas) en bijgevolg in verschillende mogelijkheden voor overleving, groei of afsterving van *Listeria monocytogenes* zowel tijdens de productie, de rijping en de bewaring. Daarbij kan ingesloten worden van welke grondstof men vertrekt, zijnde de diersoort waarvan de melk of wei afkomstig is, het vetgehalte van de melk, het feit of het om rauwe of verhitte melk gaat, enz. Deze factoren zijn zeker relevant met betrekking tot de mogelijke aanwezigheid en het gedrag van *Listeria monocytogenes*. Wat het pekelen (droog of in pekelen) en dus het finale zoutgehalte in de kaas betreft, bestaan er geen voorschriften.

In bijlage 3 wordt een voorstel van classificatie van kazen weergegeven. Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat de resultaten van provocatietesten kunnen geëxtrapoleerd worden naar loten van eenzelfde type kaas zoals bepaald door gelijkaardige kenmerken voor de factoren opgenomen in bijlage 3.

Wanneer het type kaas verandert door een wijziging van minstens één van de bovenvermelde factoren die zorgen voor gewijzigde eigenschappen van de kazen, kunnen de resultaten van provocatietesten niet meer gebruikt worden en is een hervalidatie d.m.v. nieuwe provocatietesten noodzakelijk.

5.2. Houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in kaas

5.2.1. Alternatief voor provocatietest

In welke mate kan een houdbaarheidstest voor *Listeria monocytogenes* in kaas als alternatief voor een provocatietest dienen?

Houdbaarheidstesten hebben als voordeel dat ze de realiteit beter kunnen nabootsen aangezien het gaat om natuurlijke contaminaties. Bij een houdbaarheidstest zal het initieel contaminatieniveau wellicht lager liggen dan het initieel contaminatieniveau dat beoogd wordt bij een provocatietest en bijgevolg zijn meer herhalingen nodig om de onzekerheid verbonden aan de variabiliteit van de lagfase van de individuele cellen, en dus ook het waargenomen groeipotentieel te reduceren. Er zijn echter twee mogelijke opties om houdbaarheidstesten uit te voeren en te interpreteren:

1. Bij optie 1 zal men gebruik maken van houdbaarheidstesten met het oog op het opbouwen van historische data die aantonen dat de voedselveiligheid van de kaas geborgd wordt voor de consument tot op het einde van de houdbaarheidstermijn. Dergelijke houdbaarheidstesten kaderen eerder in de verificatie van de systematische beheersing van de voedselveiligheid (Zwietering *et al.*, 2016). In dit geval zullen analyses uitgevoerd worden op diverse loten van een bepaald type kaas, waarbij per lot een aantal eenheden zullen bemonsterd en geanalyseerd worden (**het aantal eenheden wordt verder besproken in punt 5.2.5.**, waar ook de regel $n/N < 10\%$ geduid wordt). Hierbij worden, zoals beschreven in het technisch richtsnoer (punt 4.3), analyses (telling van *Listeria monocytogenes*) enkel op het einde van de houdbaarheidstermijn uitgevoerd. In dit geval wordt verwacht dat de overgrote meerderheid van de loten niet gecontamineerd zijn met *Listeria monocytogenes*. Deze analyses zijn dus eerder geschikt om een *track record* op te bouwen dat de kans op het aantreffen van verhoogde aantallen van *Listeria monocytogenes* (≥ 100 kve/g) binnen een lot op het einde van de houdbaarheidstermijn beperkt is. Gezien er in dit geval geen analyses gebeuren op dag 0 van de houdbaarheidstermijn laten dergelijke houdbaarheidstesten niet toe om het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* te beoordelen.
2. Bij optie 2 zal men gebruik maken van houdbaarheidstesten van specifieke loten waar bij voorafgaande analyse van één of meerdere eenheden van het lot een natuurlijke besmetting van de kaas met *Listeria monocytogenes* per 25 gram werd vastgesteld. Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat een houdbaarheidstest op een dergelijk van nature gecontamineerd lot met monsternamen en analyse op zowel dag 0 (of in het begin van de houdbaarheidstermijn na het vaststellen van de *Listeria monocytogenes* contaminatie) als op het einde van de houdbaarheidstermijn als alternatief kan dienen voor een provocatietest. Dit kan op voorwaarde dat er op dag 0 en op het einde van de houdbaarheidstermijn voldoende eenheden van het lot onderworpen worden aan microbiologische analyse voor detectie of telling van *Listeria monocytogenes*. **De vereisten hieromtrent worden verder besproken in punt 5.2.3.** Zoals ook gesteld in punt 5.1.5., is het Wetenschappelijk Comité van mening dat resultaten van houdbaarheidstesten enkel geëxtrapolerd kunnen worden naar loten van eenzelfde type kaas.

5.2.2. Metingen van pH en a_w

Op welk moment en op hoeveel monsters van hoeveel loten dienen de pH en a_w gemeten te worden, wetende dat deze parameters evolueren naargelang de houdbaarheid van de kaas en hoeveel herhalingen dienen uitgevoerd te worden?

Hiervoor gelden dezelfde vereisten als voor provocatietesten (zie punt 5.1.2.). Dit dient te gebeuren in de kern en/of op het oppervlak van de kaas, overeenkomstig de meest waarschijnlijke contaminatieroute.

5.2.3. Microbiologische analyses

Op hoeveel monsters van hoeveel loten dienen de microbiologische analyses uitgevoerd te worden?

In het geval van optie 1 vermeld in punt 5.2.1. kunnen bijvoorbeeld gedurende één jaar *at random* vijf monsters voor een voldoende aantal loten geanalyseerd worden op aantallen van *Listeria monocytogenes* op het einde van de houdbaarheidstermijn. Deze resultaten kunnen dienen om de systematische borging van de voedselveiligheid bij de gegeven houdbaarheidstermijn en de bijhorende bewaarcondities aan te tonen.

Wanneer een lot positief bevonden wordt voor *Listeria monocytogenes*, kan men gebruik maken van houdbaarheidstesten zoals beschreven in optie 2 vermeld in punt 5.2.1. De voorafgaande stress en de aanhechting van de *Listeria monocytogenes* stammen zullen hierbij beter de werkelijkheid weerspiegelen onder deze natuurlijke omstandigheden. Echter, natuurlijk gecontamineerde monsters bevatten meestal lage aantallen van *Listeria monocytogenes* (< 50 kve/g) en de minder gecontroleerde omstandigheden (meer heterogeniteit van de contaminatie) zullen zorgen voor een hogere variabiliteit in de resultaten van de vaststelling van het groeipotentieel (Francois *et al.*, 2006). Bijgevolg is het aanbevolen bij dergelijke houdbaarheidstesten van het natuurlijk besmette lot een 30-tal monsters te nemen en te analyseren d.m.v. tellingen (of in het geval van lage aantallen (< 50 kve/g) met behulp van de methode van schatting van de meest waarschijnlijke aantallen (MPN-methode)) in het begin en op het einde van de houdbaarheidstermijn i.p.v. in 3-voud zoals voor artificieel geïnoculeerde monsters (met ca. 100 kve/g *Listeria monocytogenes*) bij provocatietesten.

Indien houdbaarheidstesten zoals in optie 2 werden uitgevoerd voor een bepaald type kaas en dit met drie verschillende natuurlijk gecontamineerde loten in maximum de laatste drie jaren en er minstens 30 monsters per lot zowel in het begin als op het einde van de houdbaarheidstermijn geanalyseerd werden, dan kunnen de resultaten van deze houdbaarheidstesten geëxtrapoleerd worden naar andere loten van hetzelfde type kaas (zie bijlage 3). Dergelijke houdbaarheidstesten met natuurlijk gecontamineerde monsters kan mogelijks beperkt worden tot één lot indien dit gemotiveerd wordt – net zoals bij provocatietesten met artificieel geïnoculeerde loten – op basis van een groei/geen groei-grensmodule of op basis van een calculator die de variabiliteit tussen de betrokken loten van een bepaald type kaas berekent (zie punt a. in punt 3.2.1.2 van het technisch richtsnoer).

Indien minder dan drie (of het aantal bekomen via module of calculator zie hoger) houdbaarheidstesten werden uitgevoerd, dan dient ofwel optie 1 gevolgd te worden qua houdbaarheidstesten of kan toch gekozen worden om nog bijkomende provocatietesten uit te voeren (met artificieel geïnoculeerde monsters) op andere loten (met monsternamen en analyse van 3 testeenheden per lot). Hierbij dient het aantal van provocatietesten in combinatie met het aantal houdbaarheidstesten (optie 2 met natuurlijk gecontamineerd lot) in totaal drie loten te betreffen (of het aantal bekomen via module of calculator zie hoger), opdat de resultaten de variabiliteit van de loten van een type kaas voldoende afdekken zodat de resultaten kunnen geëxtrapoleerd worden naar andere loten van hetzelfde type kaas.

5.2.4. Bewaartemperatuur en -duur

Welke zijn de aanbevelingen voor de bewaartemperatuur en -duur of andere factoren die belangrijk zijn om rekening mee te houden?

Hiervoor gelden dezelfde vereisten als voor provocatietesten (zie punt 5.1.4.).

5.2.5. Interpretatie van technisch richtsnoer

- a. Hoe dient de regel $n/N < 10$ % geïnterpreteerd te worden en is een interpretatie van meer dan 10 monsters op een lot met 100 pakketten/eenheden juist?

Deze regel is afkomstig uit het boek “Statistique. La théorie et ses applications” van Michel Lejeune (2^{de} editie, 2010). Bij houdbaarheidstesten heeft men te maken met een enkelvoudige aselechte steekproef, waarbij ieder element een gelijke kans heeft om geselecteerd te worden uit de populatie en waarbij de elementen niet onderling verwisselbaar zijn. Om hieraan te voldoen, dient de populatiegrootte (N) voldoende groot te zijn en dient de bemonsteringsgrootte (n) < 10 % van de populatiegrootte te bedragen. Daarnaast dient een voldoende aantal monsters genomen te worden teneinde een aanvaardbaar betrouwbaarheidsinterval te bekomen.

De interpretatie van meer dan 10 monsters op een lot met 100 pakketten is niet correct. Volgens de regel zijn minder dan 10 monsters op een lot met 100 pakketten een juiste interpretatie.

Op basis van deze regel kan de mate van borging van voedselveiligheid van een lot bepaald worden, maar kan niet aangetoond worden of *Listeria monocytogenes*, indien aanwezig, kan uitgroeien in de kaas of niet. Voor dit laatste wordt verwezen naar punt 5.2.3. (optie 1 van houdbaarheidstesten). De resultaten kunnen wel gebruikt worden als historische gegevens ter ondersteuning van het aantonen van goede werk- en hygiënische praktijken (GMP en GHP), het respecteren van HACCP-gebaseerde principes voor de borging van de voedselveiligheid en het adequaat vaststellen van de bewaarcondities. Dergelijke houdbaarheidstesten zijn dus eerder te zien als een continue verificatie van de implementatie van voedselveiligheidsbeheerssystemen (Zwietering *et al.*, 2016).

- b. Op welke manier dient de tabel met betrekking tot de p-waarden en betrouwbaarheidsintervallen geïnterpreteerd te worden en voor welke gevallen worden de risico's als zijnde laag dan wel hoog ingeschat?

Deze tabel dient om het risico van een onbekend lot op de volksgezondheid te beoordelen. Volgens de regel $n/N < 10\%$ dient een geschikt aantal te analyseren testeenheden (n) geselecteerd te worden. Afhankelijk van het aantal geanalyseerde testeenheden met meer dan 100 kve van *Listeria monocytogenes* per gram (r), kan men dan de geschatte proportie eenheden met meer dan 100 kve van *Listeria monocytogenes* per gram voor de volledige populatie (P) berekenen met een bijhorend betrouwbaarheidsinterval. Op die manier verkrijgt men een kwantitatieve inschatting van het risico voor het bemonsterde lot. Het is de taak van de operator om aan te tonen dat het voedselveiligheidsrisico van zijn product als aanvaardbaar beschouwd kan worden voor de volksgezondheid in het kader van de verificatie van zijn voedselveiligheidsbeheerssysteem gebaseerd op de GMP, GHP en de HACCP-principes.

6. Conclusie

Listeria monocytogenes kan kaas contamineren via verschillende contaminatieroutes. Het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* kan bestudeerd worden door middel van provocatietesten en/of houdbaarheidstesten. Initiële contaminatie van kaas met *Listeria monocytogenes* kan afkomstig zijn van de (rauwe) melk die gebruikt werd voor de productie van de kaas, van de productieomgeving (apparatuur, gereedschap, infrastructuur, enz.) of van het personeel betrokken bij de productie, de rijping, de affinage, het versnijden en het verpakken van de kaas.

Een contaminatie die afkomstig is van de (rauwe) melk kan gesimuleerd worden door een inoculatie in melk die gebruikt wordt voor de productie van kaas (via een pilootstudie) of door een inoculatie in de kern van de kaas. De keuze van de wijze van artificiële inoculatie van *Listeria monocytogenes* (inoculatie in de kern en/of op het (snij)oppervlak van de kaas) is afhankelijk van de meest waarschijnlijke contaminatieroute welke afhankelijk is van het type kaas, de fysisch-chemische eigenschappen, het productieproces van de kaas en de doelstelling van de opdrachtgever. Het inoculum kan de intrinsieke eigenschappen van het product ter hoogte van de injectiezones mogelijks wijzigen. Daarom wordt in het technisch richtsnoer gesteld dat de verhouding tussen het inoculum en het product niet hoger dan 1 % van de massa (of het volume) van de testeenheid mag zijn. Conform het technisch richtsnoer moet de inoculatie worden uitgevoerd na de rijping van de kaas op de eerste dag van de

houdbaarheidstermijn (dag 0), m.a.w. het moment dat de kaas als kant-en-klaar levensmiddel op de markt wordt gebracht. Eventueel heeft de kaas een etiket dat de aanbevolen bewaarcondities specificeert. Conform het technisch richtsnoer dient het initieel contaminatieniveau ca. 100 kve (kolonievormende eenheden)/g te bedragen. Een geschat groeipotentieel van > 0,5 log-eenheden bij een initieel contaminatieniveau van 100 kve/g wordt niet als significant verschillend beschouwd ten opzichte van een te verwachten groeipotentieel bij een initieel contaminatieniveau van 10 kve/g. Provocatietesten dienen bij voorkeur uitgevoerd te worden met goed gekarakteriseerde stammen van *Listeria monocytogenes* zoals voorgeschreven in het technisch richtsnoer en niet met stammen van *Listeria innocua*.

Zowel voor provocatietesten als voor houdbaarheidstesten dienen de metingen van de pH en a_w op dag 0 en op de laatste dag van de houdbaarheid eenmaal op één monster per lot te gebeuren. Deze dienen te gebeuren in de kern en/of op het oppervlak van de kaas, ter hoogte van de plaats van inoculatie bij een provocatietest of overeenkomstig de meest waarschijnlijke contaminatieroute bij een houdbaarheidstest. De aanbevelingen voor bewaarduur en -temperatuur worden weergegeven in tabel 3 van het technisch richtsnoer en worden verder toegelicht in de dienstnota van het FAVV. De resultaten van provocatietesten en houdbaarheidstesten kunnen enkel geëxtrapoleerd worden naar loten van eenzelfde type kaas. Houdbaarheidstesten kunnen als alternatief dienen voor provocatietesten, indien er voldoende analyses werden uitgevoerd op zowel dag 0 als de laatste dag van de houdbaarheidstermijn.

7. Aanbevelingen

Gezien de mogelijke heterogeniteit in gefermenteerde artisanale producten zoals zachte en halfharde kazen op basis van rauwe of gepasteuriseerde melk, is het zo dat bij een inschatting van het groeipotentieel met provocatiestests er nog steeds een zekere residuele kans blijft bestaan dat uitgroei in andere loten kaas of kaas met gelijkaardige eigenschappen in enige mate wordt onderschat of overschat. Voor de beoordeling van het risico ten gevolge van *Listeria monocytogenes* in kaas zijn provocatietesten en houdbaarheidstesten een hulpmiddel, maar ze zijn niet de enige manier om het risico te beperken en zullen dus op zich het risico niet tot nul reduceren. Daarom is het belangrijk om preventief en hygiënisch te werken, om de koudeketen zo goed mogelijk te respecteren en om kruiscontaminaties met *Listeria monocytogenes* te vermijden. Met behulp van de GMP en GHP dient men te streven naar afwezigheid van *Listeria monocytogenes* in kaas.

Het is aan te raden om meer verduidelijking te verschaffen over de volgende zaken in het technisch richtsnoer van het EURL *Lm*:

- de methoden voor het uitvoeren van provocatietesten op gefermenteerde levensmiddelen,
- de bemonstering van een product dat geïnoculeerd is op het oppervlak of in de kern,
- het al dan niet noodzakelijk zijn van het aanpassen van de pH en a_w van een inoculum,
- het aantal houdbaarheidstesten van natuurlijke gecontamineerde loten dat vereist is om provocatietesten te vervangen teneinde harmonisatie op Europees niveau te bekomen, en
- de methoden van de inoculatie en de bemonstering.

Het toepassingsgebied van de ISO-methode voor de meting van de pH dient uitgebreid te worden naar zuivelproducten en de ISO-methode voor de meting van de a_w heeft nood aan een specifieke evaluatie met betrekking tot performantiekarakteristieken voor zuivelproducten.

Ten slotte beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om onderzoek uit te voeren naar:

- het verschil in het effect van een natuurlijke contaminatie en een artificiële inoculatie van *Listeria monocytogenes* op het gedrag van deze pathogeen in en op verschillende types van kazen,
- de invloed van verschillende types van starterculturen op het gedrag van *Listeria monocytogenes* binnen een bepaald type kazen, en
- de invloed van fysico-chemische parameters op het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* in en op kazen teneinde het extrapoleren van resultaten van provocatietesten en/of houdbaarheidstesten naar een groter aantal types kazen mogelijk te maken.

Voor het Wetenschappelijk Comité,
De Voorzitter,

Prof. Dr. E. Thiry (Get.)

Brussel, 01/03/2016

Referenties

- Ceuppens, S., Van Boxtael, S., Westyn, A., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2015. The heterogeneity in the type of shelf life label and storage instructions on refrigerated foods in supermarkets in Belgium and illustration of its impact on assessing the *Listeria monocytogenes* threshold level of 100 CFU/g. *Food Control* 59, 377-385.
- EFSA, 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal* 11(6), 3241. Beschikbaar online: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3241.pdf.
- Francois, K., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Nadal, P., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2006. Single cell variability of *L. monocytogenes* grown on liver pâté and cooked ham at 7 °C: comparing challenge test data to predictive simulation. *Journal of Applied Microbiology* 100, 800-812.
- Lahou, E., Uyttendaele, M., 2015. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in soft, semi-soft and semi-hard artisanal cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, submitted for publication.
- Montel, M., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177, 136-54.
- Østegaard, N. B., Christiansen, L. E., Dalgaard, P., 2015. Stochastic modelling of *Listeria monocytogenes* single cell growth in cottage cheese with mesophilic lactic acid bacteria from aroma producing cultures. *International Journal of Food Microbiology* 204, 55-65.
- Ross, R., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G., Coffey, A., 2000. Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science and Technology* 11, 96-104.
- Rückerl, I., Muhterem-Uyar, M., Muri-Klinger, S., Wagner, K. H., Wagner, M., Stessl, B., 2014. *L. monocytogenes* in a cheese processing facility: Learning from contamination scenarios over three years of sampling. *International Journal of Food Microbiology* 17, 189-198.
- Schoder, D., Strauß, A., Szakmary-Brändle, K., Wagner, M., 2015. How safe is European Internet cheese? A purchase and microbiological investigation. *Food Control* 54, 225-230.
- SciCom, 2015. Advies 02-2015 van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV over de evaluatie van de microbiologische risico's van de consumptie van zuivelproducten op basis van rauwe melk (dossier SciCom 2014/06: eigen initiatief). Beschikbaar online: http://www.favv-afsca.fgov.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/_documents/ADVIES02-2015_NL_DOSSIER_2014-06.pdf.
- Van Boxtael, S., Devlieghere, F., Berkvens, D., Vermeulen, A., Uyttendaele, M., 2014. Understanding and attitude regarding the shelf life labels and dates on pre-packed food products by Belgian consumers. *Food Control* 37, 85-92.
- Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M., Herman, L., 2015. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal* 50, 32-44.
- Zwietering, M. H., Jacxsens, L., Membré, J.-M., Nauta, M., Peterz, M., 2016. Relevance of microbial finished product testing in food safety management. *Food Control* 60, 31-43.

Leden van het Wetenschappelijk Comité

D. Berkvens, A. Clinquart, G. Daube, P. Delahaut, B. De Meulenaer, S. De Saeger, L. De Zutter, J. Dewulf, P. Gustin, L. Herman, P. Hoet, H. Imberechts, A. Legrève, C. Matthys, C. Saegerman, M.-L. Scippo, M. Sindic, N. Speybroeck, W. Steurbaut, E. Thiry, M. Uyttendaele, T. van den Berg

Belangenconflict

Er werden geen belangenconflicten vastgesteld.

Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt de Stafdirectie voor risicobeoordeling, de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerpadvies en F. Devlieghere en G. Daube voor de 'peer review' van het advies.

Samenstelling van werkgroep

De werkgroep was samengesteld uit:

Leden Wetenschappelijk Comité	M. Uyttendaele (verslaggever), L. Herman, L. De Zutter, M. Sindic
Externe experts	M. Polet (WIV-ISP, NRL), G. Vlaemynck (ILVO), A. Geeraerd (KUL), V. Delcenserie (ULg), B. Pochet (FAVV)
Dossierbeheerder	C. Verraes

De activiteiten van de werkgroep werden opgevolgd door de volgende leden van de administratie: V. Cantaert (FAVV).

Wettelijk kader van het advies

Wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8;

Koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen;

Huishoudelijk reglement, bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 09 juni 2011.

Disclaimer

Het Wetenschappelijk Comité behoudt zich, te allen tijde, het recht voor dit advies te wijzigen indien nieuwe informatie en gegevens ter beschikking komen na de publicatie van deze versie.