

Probabilités de contamination du lait par *Listeria monocytogenes* pendant la fabrication du fromage à pâte dure

*Quantification of the probability of milk contamination by *Listeria monocytogenes* during manufacture of hard cheese*

E. SCHAFFNER, M. MÜHLEMANN, U. SPAHR, M. SCHÄLLIBAUM

Station de Recherches Laitières Liebefeld, CH-3003 Bern, Suisse. (Tirés à part : E. Schaffner, 5, Rue du Moulin, 68510 Kappel, France)

Background: The present work is concerned with the probability of contamination by *Listeria monocytogenes* in the artisanal manufacture of Swiss Emmental hard cheese made from raw milk. The simulation model follows the evolution of the contaminant flora from raw milk at the farm to milk mixing, storage at the cheese factory and to the cheese manufacturing process.

Methods: The simulations are based on models of predictive microbiology, namely the exponential growth model of bacteria including the lag-time, a cardinal growth model and a Log-linear model of thermal deactivation of bacteria.

Results: The results of the actual simulation indicate that the contamination of milk at the farm is a rare event ($P=0.0036$), but the mixing of milk at the cheese factory leads to a higher probability of contamination of cheese milk ($P=0.07$). Elevated bacterial concentrations are mainly due to cases of mastitis involving *Listeria monocytogenes*. The decline in bacterial counts during cheese manufacture depends on the curing temperature (52-54°C) and varies between 1.5 and 3.2 Log cfu/ml. Freshly manufactured Emmental-cheese made from contaminated raw milk is expected to have only 4.6 cfu of heat injured *Listeria monocytogenes* /kg cheese mass in the press.

Conclusion: Depending on listeria evolution, from the press to the product consumption, consumer exposure has been evaluated and might result in 1 to 10 *Listeria monocytogenes* per portion of cheese. The bacterial presence could be due to recontamination during packaging, distribution and cheese preparation by the consumer. Based on the presented data and estimations, it is concluded that the consumption of traditionally/artisanal manufactured Swiss Emmental hard cheese presents an extremely low, but existent risk, especially for people with a deficient or diminished immune system.

*Predictive Microbiology. Simulation. Exposure Assessment. *Listeria monocytogenes*. Swiss Emmental Cheese.*

*Le présent travail porte sur la probabilité de contamination par *Listeria monocytogenes* du lait cru utilisé pour la fabrication artisanale d'Emmental suisse. La modélisation suit l'évolution de la flore contaminante, issue du lait cru, de la ferme jusqu'au mélange de lait et son entreposage à la fromagerie de même qu'en cours de fabrication.*

Les simulations se basent sur des modèles de microbiologie prévisionnelle, notamment sur un modèle de croissance exponentielle des bactéries incluant la phase de latence, un modèle cardinal de croissance et un modèle Log-linéaire de désactivation thermique des bactéries.

Texte reçu le 15 octobre 2003. Acceptation définitive le 1^{er} avril 2003.

Les résultats de la simulation indiquent que la contamination du lait à la ferme est un événement rare ($P = 0,0036$). Par contre, le mélange de lait à la fromagerie conduit à un risque de contamination plus élevé du lait de fabrication ($P = 0,07$). Une charge bactérienne élevée est le plus souvent due à des mastites provoquées par *Listeria monocytogenes*. La diminution du nombre de bactéries en cours de fabrication dépend de la température de cuisson (52-54°C) et varie entre 1,5 et 3,2 Log ufc/ml. Un Emmental fraîchement fabriqué uniquement avec du lait cru contaminé aura environ 4,6 ufc de *Listeria monocytogenes* endommagées par la chaleur/kg de masse fromagère sous presse.

Selon l'évolution des *Listeria*, de la mise sous presse jusqu'à la consommation du produit, l'appréciation grossière de l'exposition possible des consommateurs pourrait se situer entre 1 à 10 *Listeria monocytogenes* par portion de fromage. Ces *Listeria* proviennent de re-contaminations locales pendant l'emballage, la distribution ou le traitement du fromage par le consommateur (conservation, préparation et consommation). En se basant sur les données présentées et les estimations, on peut considérer que la consommation de l'Emmental suisse de fabrication artisanale représente un risque extrêmement faible pour la santé des consommateurs, mais existant, surtout pour des personnes ayant une déficience ou une diminution des défenses immunitaires.

Microbiologie prévisionnelle. Simulation. Évolution de l'exposition. *Listeria monocytogenes*. Emmental suisse.

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes est une bactérie pathogène ubiquitaire qui survit ou se développe dans certains aliments. En cas de consommation de denrées contaminées, elle peut provoquer la listériose humaine. Cette maladie est surtout contractée par des personnes ayant une déficience ou une diminution des défenses immunitaires (malades immunodéprimés, personnes âgées, femmes enceintes), mais peut également toucher en cas de contamination importante des personnes en bonne santé [1].

Les conditions artisanales de fabrication et d'entreposage/affinage du fromage suisse au lait cru et à pâte dure de type Emmental semblent ne permettre ni la survie ni la multiplication de la bactérie. Des inoculations artificielles de 4×10^4 bactéries/ml de lait n'ont pas pu être détectées un jour après la fabrication et toutes les déterminations subséquentes restaient libres de *Listeria monocytogenes* [2]. Pour différentes raisons, les résultats obtenus pour la fabrication de fromages expérimentaux à partir de lait inoculé artificiellement avec *Listeria monocytogenes* ont une valeur limitée : le nombre de fromages, les conditions optimales de fabrication et l'inoculation artificielle ne permettent aucune observation de l'évolution de *Listeria monocytogenes* à des conditions suboptimales, telles qu'on les rencontre dans la pratique. Afin de mieux apprécier les probabilités liées à une contamination par *Listeria monocytogenes* du lait servant à la fabrication du fromage suisse au lait cru et à pâte dure de

type Emmental, un modèle a été développé avec le logiciel @RISK (version 4.0, Palisade Corporation, Newfield, NY, USA) utilisant la méthode de simulation de Monte Carlo. Ces simulations sont issues de la modélisation de l'évolution bactérienne à partir des caractéristiques de la ferme et de la fromagerie jusqu'à la mise sous presse dans la fromagerie. Le modèle quantitatif proposé s'arrête à l'estimation de la concentration de *Listeria monocytogenes* dans le fromage mis sous presse. La figure 1 donne la structure du modèle.

MÉTHODES

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

La modélisation de la dynamique de croissance et de décroissance de la population de *Listeria monocytogenes* a été effectuée à partir des modèles de microbiologie prévisionnelle. La microbiologie prévisionnelle décrit le comportement des micro-organismes à l'aide de modèles statistiques qui peuvent être répartis dans deux catégories : les modèles primaires, décrivant les cinétiques de croissance ou de décroissance, et les modèles secondaires, permettant de décrire l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres primaires.

Le modèle principal obtenu décrit l'évolution de la concentration de *Listeria monocytogenes* pendant la transformation en fromage de lait contaminé.

Les résultats du modèle reposent sur des simulations obtenues par la méthode de Monte Carlo. Les entrées du modèle ainsi que ses résultats sont souvent sous la forme de distributions de probabilité. Une simulation prend en compte les résultats d'un grand nombre (fixé par l'utilisateur) d'itérations effectuées par le logiciel @RISK.

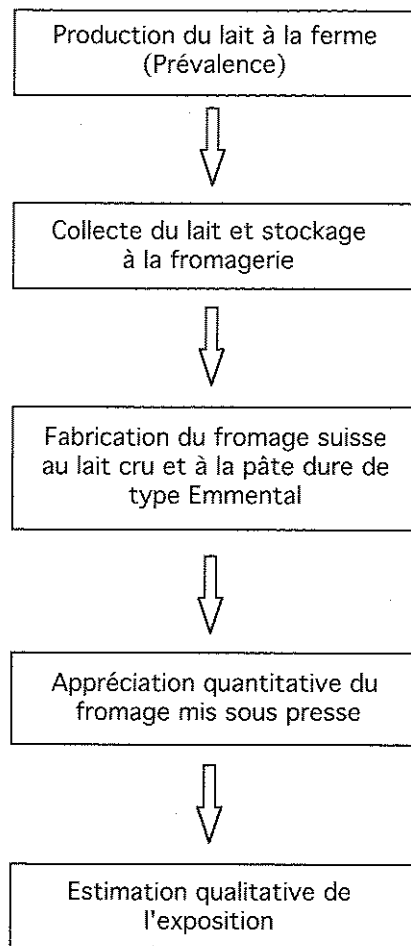


FIG. 1. — Schéma général du modèle.

À chaque itération d'une simulation, la méthode de simulation de Monte Carlo choisit au hasard un nouvel ensemble de valeurs parmi les distributions de probabilité qui sont les entrées du modèle. Ce jeu de valeurs est utilisé dans la simulation pour générer un nouveau résultat à chaque itération. Les sorties du modèle obtenues à la fin d'une simulation sont les distributions de ces nouveaux résultats. Cette technique permet de décrire la diversité des situations possibles en initialisant les calculs à partir de distributions de probabilité au lieu d'estimations ponctuelles. Les distributions de probabilité permettent d'associer des probabilités faibles à des événements rares mais plausibles pour mieux décrire la réalité. Les modèles utilisés sont décrits ci-après.

CONSTRUCTION DU MODÈLE PRINCIPAL

Le modèle principal a été construit suivant les trois étapes de la transformation du lait en fromage : la production du lait à la ferme, la collecte du lait et le stockage à la fromagerie, la fabrication du fromage. Le modèle a été développé en se basant, aussi souvent que possible, sur des données spécifiques à la fabrication du fromage suisse au lait cru et à pâte dure de type Emmental. D'autres données sont issues de la littérature traitant de *Listeria monocytogenes* [3, 4]. Des modèles de microbiologie prévisionnelle intégrés dans le modèle principal permettent d'obtenir des estimations quantitatives sur l'évolution des micro-organismes en réponse aux conditions du milieu. La liste des variables utilisées dans le modèle principal est présentée dans le *tableau I*.

MODÉLISATION DE LA PRODUCTION DU LAIT À LA FERME

La contamination du lait par *Listeria monocytogenes* peut apparaître au niveau de la ferme puis se propager au niveau de la fromagerie. Sur 4 046 fermes testées en Suisse, le lait de 14 fermes était contaminé (seuil de détection : 1 bactérie/10 ml) [2]. La probabilité P pour qu'une ferme ait du lait contaminé a été décrite dans le modèle par une loi bêta (14 + 1 ; 4046 - 14 + 1) [5].

Une contamination par *Listeria monocytogenes* peut être d'origine environnementale (ensilage, mauvaise hygiène à la

TABLEAU I. — Liste des variables et distributions associées utilisées dans le modèle principal au niveau de la ferme et de la fromagerie.

Variabes	Description	Unité	Distributions/Modèle
Prévalence	Prévalence des fermes avec du lait contaminé	—	Beta(15,4033)
F	Fraction des infections de type mammite à <i>L. monocytogenes</i>	—	Beta(4,31)
(1-F)	Fraction des contaminations d'origine environnementale	—	
B	Indice de contamination du lait égal 1 si le lait est contaminé et 0 sinon	—	Bernoulli{P}
T	Indice du type de contamination égal 0 pour une contamination d'origine environnementale et 1 sinon	—	Bernoulli{F}

TABLEAU I. (SUITE) — Liste des variables et distributions associées utilisées dans le modèle principal au niveau de la ferme et de la fromagerie.

Variables	Description	Unité	Distributions/Modèle
H	Nombre des vaches par troupeau	—	Normal(14,6;7,2; truncated(2;))
N	Concentration de <i>L. monocytogenes</i> provenant d'un quartier infecté de la mammite	cfu ml ⁻¹	Triangulaire (2 000;30 000;10 ⁶ ;5;95)
C _m	Concentration dans le lait de tank (à la ferme) pour une infection de type mammite à <i>L. monocytogenes</i>	cfu ml ⁻¹	N/4H
C _e	Concentration dans le lait de tank (à la ferme) pour une contamination d'origine environnementale	cfu ml ⁻¹	Log-normal(5;3)
C	Concentration dans le lait de tank (à la ferme)	cfu ml ⁻¹	Si B = 0 alors C = 0 sinon C = (1-T)*C _e +T*C _m
M	Volume de lait utilisé à la fromagerie	L	Triangulaire(2 000; 4 000; 8 000)
V _v	Volume de lait quotidien produit par une vache	L	Normal(16,6;2)
N _f	Nombre de fermes fournissant du lait à la fromagerie	—	Partie Entière(M/Vv/Herd size;0)
N _{fc}	Nombre de fermes avec du lait contaminé 0 ≤ N _{fc} ≤ 4	—	Binomial(N _f ;P)
V _k k = 1,...,N _{fc}	Volume de lait de la ferme k ayant du lait contaminé	L	V _v *H
T _k k = 1,...,N _{fc}	Type de contamination pour chaque lait contaminé	—	Bernoulli[F]
C _i	Concentration de <i>L.m.</i> dans le lait entrant à la fromagerie	cfu ml ⁻¹	Σ((1-T _j)C _e +T _j *C _m)/V _j /M j = 1,...,N _{fc}
(t ₁ ,p ₁);(t ₂ ,p ₂); (t ₃ ,p ₃)	Durées de conservation du lait à la fromagerie et probabilités associées à chacune 98,35 %; 0,83 %; 0,82 %	(h, —)	Respectivement Uniform(10;12) , 24 ; 48
T ₁ , T ₂ ,T ₃	Températures de conservation associées respectivement à t ₁ , t ₂ , t ₃	°C	Respectivement Triangulaire(10,14,18), 6, 4
(d, T)	Durée et température de conservation effectives	(h, °C)	Bernoulli(p ₂); Bernoulli(p ₁)
pH	pH du lait	—	6,4
ρ(pH)	Effet du pH sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> (pH _{min} : = 4.5;pH _{opt} : = 7;pH _{max} : = 9)	—	CM ₁
τ(T°)	Effet de la température sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> (T _{min} : = 5°;T _{max} : = 45°;T _{opt} : = 37°)	—	CM ₂
μ _{max}	Taux de croissance maximum (en logarithme décimal)	h ⁻¹	μ _{max} = μ _{opt} *τ(T°)*ρ(pH)+ ε modèle cardinal Rosso 1998
t _{lag}	Temps de latence	h	μ _{max} *t _{lag} = K = 2,14
C ₂	Concentration finale de <i>L. monocytogenes</i> dans le lait avant la fabrication du fromage	cfu ml ⁻¹	Log(C ₂) = Log(C ₁)+μ _{max} (t-t _{lag}) si t > t _{lag} sinon Log(C ₂) = Log(C ₁)

TABLEAU I. (SUITE) — Liste des variables et distributions associées utilisées dans le modèle principal au niveau de la ferme et de la fromagerie.

Variables	Description	Unité	Distributions/Modèle
d_i	Intervalle de temps entre deux points expérimentaux qui décrivent la température pendant la fabrication	h	
a_i	Pente de la température pendant d_i	$^{\circ}\text{C h}^{-1}$	$a_i = \Delta T_i/d_i$
N_b	Nombre de points fixés formant une subdivision de chaque intervalle d_i	—	
h_i	Pas de temps de la subdivision	h^{-1}	$h_i = d_i/N$
$T_i(t)$	Température au temps t	$^{\circ}\text{C}$	
pH_i	pH pendant d_i		
C_3	Concentration pendant la fabrication du fromage quand $T_i(t)$ égal $45,5^{\circ}\text{C}$	cfu ml^{-1}	
D	Temps nécessaire à la destruction de 90 % des bactéries	h	Modèle secondaire de décroissance
T_{max}	Température de chauffage maximum	$^{\circ}\text{C}$	Uniform(52,54)
C_4	Concentration de <i>L. monocytogenes</i> avant l'entrée du fromage à la presse	cfu g^{-1}	

ferme) ou causée par un quartier de la mamelle d'un animal excréteur. Ces derniers cas de contamination sont beaucoup moins fréquents, mais plus dangereux, car ils entraînent des concentrations de bactéries dans le lait beaucoup plus élevées (jusqu'à 10^6 cfu ml^{-1}) [6]. D'après une enquête effectuée en France, parmi 33 cas de contaminations, 3 étaient de type mammite provoquée par *Listeria monocytogenes* [7]. La fraction des infections intra-mamellaires a été décrite dans le modèle par une loi bêta (4,31) [5]. Les concentrations d'origine environnementale dans le lait de citerne à la ferme (C_2) et d'une infection de type mammite par *Listeria monocytogenes* (C_m) ont été décrites respectivement par une loi lognormale (5,3) lorsqu'il s'agissait d'un cas de contamination d'origine environnementale en suivant l'avis d'expert, et par une loi trigen (2.10^3 , 3.10^4 , 10^6 , 5 %, 95 %) dans un cas causé par un animal excréteur (tableau I) [7]. La figure 1 donne la structure générale du modèle qui décrit quantitativement les niveaux de la ferme à la mise sous presse et qualitativement la situation de l'exposition.

MODÉLISATION DE LA COLLECTE DU LAIT ET DE L'ENTREPOSAGE À LA FROMAGERIE

Le nombre de fermes qui apportent du lait contaminé (N_{fc}) à la fromagerie a été modélisé par une loi binomiale de paramètres du nombre de fermes fournissant du lait à la fromagerie (N_f) et de la prévalence des fermes avec du lait contaminé. Arrivé à la fromagerie, le lait de différentes fermes est mélangé et conservé dans des citernes. Le stockage est dans 98,35 % des cas d'une durée de 11 heures à une température dont la valeur, considérée fixe à chaque itération du modèle, est comprise entre 10 et 18°C . Cependant le lait peut être stocké dans 0,83 % des cas pendant 24 heures à 6°C et dans 0,82 % des cas pendant 48 heures à 4°C [8].

Dans le cas d'une contamination, le modèle va donner des informations sur :

- la distribution du nombre de fermes ayant apporté du lait contaminé par *Listeria monocytogenes* à la fromagerie (N_{fc}) et la concentration de bactérie dans le lait de mélange (C_1) en fonction du type de contamination et du volume de lait (V_L , M) ;
- la distribution de la concentration de bactéries dans le lait de citerne à la fin de sa conservation (C_2).

MODÉLISATION DE LA FABRICATION DU FROMAGE

Lors de la transformation du lait en fromage, les conditions de température et de pH du lait sont dynamiques. En effet, le lait est chauffé jusqu'à une température maximale comprise entre 52 et 54°C , puis la température est abaissée à 45°C progressivement, tandis que le pH diminue de 6,4 à 5,3 en 2 heures. En conséquence, la population de *Listeria monocytogenes* réagira par une phase de croissance suivie d'une phase de décroissance. Dans le modèle principal, la température maximale de chauffage (T_{max}) est décrite par une loi uniforme (52,54). Ainsi la valeur de température, déterminante par son effet de destruction sur les bactéries, varie d'une itération à l'autre au cours d'une simulation.

Tant que la température n'excédait pas $45,5^{\circ}\text{C}$, des prévisions des cinétiques de croissance ont été effectuées à partir de modèles primaire et secondaire publiés en considérant les effets de la température et du pH indépendamment l'un de l'autre. La modélisation de la décroissance due au chauffage a été effectuée à partir d'un modèle secondaire de décroissance obtenu en considérant l'effet de la température uniquement [9]. L'effet de l'activité de l'eau ainsi que l'effet du ralentissement de la croissance causé par la flore fermentaire lactique n'ont pas été pris en compte. La liste des variables utilisées dans le

modèle principal et les distributions de probabilités associées à certaines d'entre elles sont présentées dans le tableau I.

Le modèle primaire de croissance utilisé dans le modèle principal pour décrire la croissance de *Listeria monocytogenes* est le modèle de croissance exponentielle avec temps de latence [10, 11] :

$$\begin{cases} \text{Log}(N) = \text{Log}(N_0) & , t \leq t_{\text{lag}} \\ \text{Log}(N) = \text{Log}(N_0) + \mu_{\text{max}}(t - t_{\text{lag}}) & , t > t_{\text{lag}} \end{cases}$$

N concentration bactérienne au temps t

N_0 concentration bactérienne initiale

t_{lag} temps de latence

μ_{max} taux de croissance maximum en logarithme décimal

Simple d'utilisation, il fait appel au nombre initial de bactéries (N_0) ainsi qu'à deux paramètres primaires de croissance : le taux de croissance maximum (μ_{max} , en logarithme décimal), et le temps de latence (t_{lag}). Pendant la fabrication du fromage, la phase de croissance des bactéries est courte. Elle est suivie d'une phase de décroissance due au chauffage. Un modèle primaire simple, qui ne prend pas en compte l'habituelle phase stationnaire, décrite par certains modèles de croissance quand la culture atteint sa densité maximale, a été choisi.

Le modèle secondaire de croissance en microbiologie prévisionnelle permet d'estimer les paramètres primaires de croissance des micro-organismes en fonction des paramètres du milieu. Ainsi ont été obtenues les estimations du taux maximum de croissance (μ_{max}) et du temps de latence (t_{lag}) de *Listeria monocytogenes* en fonction du pH et de la température du lait pendant la conservation du lait à la fromagerie et la fabrication du fromage. Le modèle secondaire utilisé dans le modèle principal est le modèle cardinal, tiré de la littérature [12] :

$$\sqrt{\mu_{\text{max}}} = g(T, \text{pH}) + \varepsilon \quad \varepsilon \text{ erreur}$$

$$g(T, \text{pH}) = \sqrt{\mu_{\text{opt}} \cdot \tau(T) \cdot \rho(\text{pH})}$$

μ_{opt} : taux de croissance maximum lorsque les conditions de croissance sont optimales (T_{opt} ; pH_{opt})

$\tau(T) = \text{CM}_2(T)$ décrit l'effet de la température sur μ_{max}

$\rho(\text{pH}) = \text{CM}_1(\text{pH})$ décrit l'effet du pH sur μ_{max}

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

X facteur environnemental : pH ou température

X_{min} valeur cardinale minimum de croissance

X_{opt} valeur cardinale optimale de croissance pour laquelle μ_{max} est égale à sa valeur optimale, μ_{opt}

X_{max} valeur cardinale maximum de croissance

n paramètre de forme

Les valeurs cardinales de *L. monocytogenes* utilisées sont : $T_{\text{min}} = -2,7 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{opt}} = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{max}} = 45,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}_{\text{min}} = 4,55$; $\text{pH}_{\text{opt}} = 7,1$; $\text{pH}_{\text{max}} = 9,61$; $\mu_{\text{opt}} = 0,837^2 / \text{Ln}(10) (\text{h}^{-1})$ [13].

$(\mu_{\text{opt}}^c)^{0,5} = 0,837$ est une estimation du taux de croissance optimum en logarithme népérien obtenue pour les produits laitiers [10].

Ce modèle est pratique à utiliser, car il fait uniquement appel à des paramètres biologiques. Il a été appliqué dès l'arrivée du lait à la fromagerie pour des températures inférieures à $45,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Cette température est considérée comme la température maximale de croissance de la bactérie *Listeria monocytogenes*.

Le modèle primaire de décroissance utilisé dans le modèle principal pour décrire la concentration de *Listeria monocytogenes* pendant la fabrication du fromage est le modèle de décroissance exponentielle causée par la température [14] :

$$\begin{cases} \text{Log}(N) = \text{Log}(N_0) - (1/D)(t - T_1) & , t > T_1 \\ \text{Log}(N) = \text{Log}(N_0) & , t \leq T_1 \end{cases}$$

T_1 : temps de latence précédant la décroissance

D : temps nécessaire à la destruction de 90 % des bactéries

N : concentration bactérienne au temps t cfu/ml

t : temps

N_0 : concentration bactérienne initiale cfu/ml

Le modèle secondaire de décroissance a été appliqué au niveau de la fromagerie dès que la température dépassait $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Ce modèle permet d'obtenir des estimations du paramètre primaire appelé temps de réduction décimale (valeur D) [15]. La valeur D est le temps d'exposition à un facteur inhibiteur (ici la température) à partir de la phase de décroissance exponentielle ($t > T_1$) nécessaire à l'élimination de 90 % des bactéries, ce qui revient à une réduction de 1 du logarithme de la concentration de bactéries.

Ce modèle a été obtenu en vérifiant dans un premier temps qu'il existait une relation linéaire entre la température et Log(D), puis dans un second temps en calculant les paramètres de la droite de régression à partir de valeurs publiées de valeur D (fig. 2) [4]. Les estimations de la valeur D nécessaires à l'application du modèle primaire de décroissance ont été obtenues en extrapolant la relation à des températures de $50-54 \text{ }^\circ\text{C}$

(atteintes lors de la fabrication du fromage) (fig. 3). La validation du modèle proposé repose sur la visualisation graphique et sur l'hypothèse qu'il existe une relation linéaire entre Log(D) et la température (T) pour des températures comprises entre 50 et $54 \text{ }^\circ\text{C}$ [4].

APPLICATION DES MODÈLES DE CROISSANCE SOUS DES CONDITIONS (T, pH) DYNAMIQUES

Les modèles de microbiologie prévisionnelle ont été appliqués à partir de données expérimentales mesurant l'augmen-

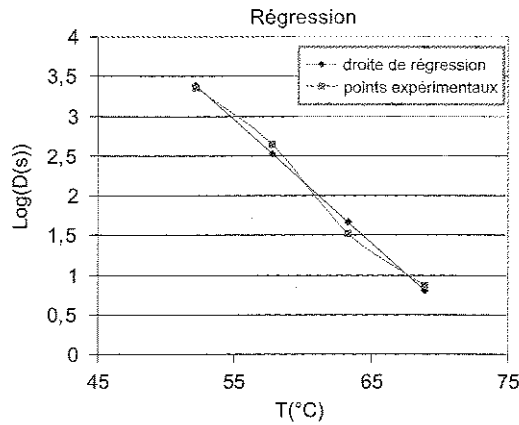


FIG. 2. — Régression linéaire de Log (D (secondes)) sur T (°C) : $\text{Log} (D) = -0.16 \cdot T + 11.15$.

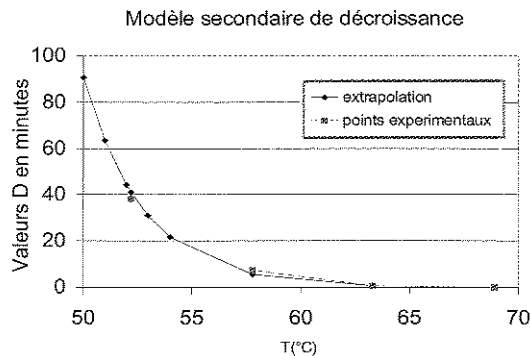


FIG. 3. — Extrapolation de la relation valeur D Température. Visualisation du modèle secondaire de décroissance en se basant sur la valeur (D) uniquement. La validation du modèle proposé repose sur l'hypothèse qu'il existe une relation linéaire entre Log (D) et la température pour des températures comprises entre 50 et 54 °C.

tation de la température et la diminution du pH en fonction du temps pendant la période de fabrication du fromage. Les modèles de croissance ont été utilisés pour des températures < 45,5 °C. La méthode utilisée pour estimer l'accroissement du nombre de bactéries consiste à effectuer une subdivision du temps sur chaque intervalle d_i , $i = 1, \dots, 5$ séparant deux points expérimentaux portant sur la température $((t_i, T_i) ; (t_i + 1, T_i + 1))$. Le pas de la subdivision vaut : $h_i = d_i/N$ et le nombre de points choisis par intervalle vaut : $N = 10$. Les valeurs du pH et de la température (supposées linéaires pour chaque intervalle d_i) sont calculées en chaque point de la subdivision. En appliquant le modèle secondaire pour chaque couple de valeur de pH et température, les estimations des paramètres primaires du taux maximum de croissance (μ_{max}) et du temps de latence (t_{lag}) sont obtenues en chaque point de la subdivision. L'hypothèse indique que le taux maximum de croissance (μ_{max}) répond instantanément aux variations de la température [16].

En partant du nombre initial de bactéries (C_i), il est alors possible d'appliquer le modèle de croissance primaire qui fournira une estimation du nombre de bactéries au temps $t + h$. En réitérant la méthode, il est possible d'estimer le nombre de bactéries au temps $t + 2h$, et par la suite sur tout le domaine de croissance de la bactérie.

$$\text{LOG} (C_{j+1}) = \text{LOG} (C_j) \quad , \quad t_j \leq t_{lag}$$

$$\text{LOG} (C_{j+1}) = \text{LOG} (C_j) + \mu_{max,j} \cdot h_i \quad , \quad t_j > t_{lag}$$

$j = 1, \dots, 50$

Détermination du temps de latence précédant la croissance bactérienne

Le produit du taux maximum de croissance avec le temps de latence ($\mu_{max} t_{lag}$) est constant et égal à $2,14/\ln(10)$ ($\mu_{e,max} t_{lag} = 2,14$ [10] ; $\mu_{e,max}$: taux maximum de croissance en logarithme népérien). Les estimations du temps de latence (t_{lag}) de *Listeria monocytogenes* ont été déduites du taux maximum de croissance (μ_{max}).

Les conditions de la conservation du lait $((t_1, T_1), \dots, (t_j, T_j))$ varient d'une itération à l'autre du modèle, de manière à décrire les différentes situations possible dans la réalité. Suivant ces conditions, la croissance de *Listeria monocytogenes* peut survenir pendant ou après la période de stockage.

À chaque itération, des estimations du temps de latence (t_{lag}) sont calculées par le modèle secondaire de croissance à partir des conditions de conservation du lait propre à l'itération, et aussi à partir du couple de la température au temps t et l'intervalle de temps entre deux points expérimentaux qui décrivent la température pendant la fabrication ($T_i(t), \text{pH}_i$) issu des courbes expérimentales de température et de pH décrivant les conditions dynamiques lors de la fabrication du fromage suisse au lait cru et à pâte dure de type Emmental [2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17].

Les valeurs du temps de latence (t_{lag}), obtenues en fonction des conditions (température, pH) au temps t , sont comparées à t qui est le temps écoulé depuis le début de l'entreposage du lait.

À chaque itération, le temps de latence retenu et pris en compte dans le modèle primaire de croissance sera celui correspondant au premier instant t tel que $t_{lag} < t$.

APPLICATION DES MODELES DE DÉCROISSANCE SOUS DES CONDITIONS (T, pH) DYNAMIQUES

Le modèle secondaire de décroissance a été appliqué pour des températures ≥ 50 °C. Les valeurs D ont été calculées en chaque point de la subdivision du temps correspondant à des températures supérieures à 50 °C. L'origine du temps t est fixée à l'instant où la température T atteint 50 °C. La courbe expérimentale qui décrit la température pendant le chauffage est successivement croissante jusqu'à la température maximale (T_{max}), constante, puis décroissante. Le temps (T_1) marquant le début de la diminution de la température maximale à la température de 45,5 °C représente la frontière entre deux domaines déterminants dans l'application du modèle primaire de décroissance. Lorsque le temps est croissant jusqu'à la température maximale ($0 \leq t \leq T_1$), la courbe de température est monotone croissante, donc la courbe de valeur D (T) obtenue par le modèle secondaire est monotone décroissante. En cha-

que point de la subdivision, la valeur $D(T_j)$ est comparée au temps restant $(t_f - t_j)$. Le minimum parmi les t_j qui vérifie l'inéquation valeur $D(T_j) \leq (T_f - t_j)$ sera l'instant de la première réduction unitaire du log du nombre de bactéries. Elle intervient toujours lorsque la température est maximale et constante.

Lorsque le temps t est supérieur à la température maximale (T_f ($t > T_f$)), la courbe de température est décroissante, et donc la valeur $D(T)$ est croissante en fonction du temps, le logarithme de la concentration de bactéries au temps t_{j+1} est déduit de celle au temps t_j selon la formule :

$$\text{Log}(N_{j+1}) = \text{Log}(N_j) - \frac{h_j}{D_{j+1}}$$

Le temps de latence de *Listeria monocytogenes* précédant la décroissance (T) a été supposé égal à l'intervalle de temps pendant lequel la température passe de 45,5 °C à 50 °C.

RÉSULTATS

Dans un premier temps, des simulations ont été effectuées en tenant compte de l'occurrence de la contamination du lait de ferme par *Listeria monocytogenes* (N_f , (tableau II)). Puis, dans un second temps, ont été simulés des cas de contamination du lait de mélange dans la fromagerie en affectant un entier strictement positif au nombre de fermes fournissant du lait contaminé (N_{fc} , (tableau IIa)).

La prévalence des fermes avec du lait contaminé par *L. monocytogenes* (N_{fc}) est très faible ($P = 0,0036$), mais la simulation montre que la probabilité que le lait de mélange entrant à la fromagerie soit contaminé est de $P = 0,07$. D'après la simulation, la moyenne du nombre de fermes qui

TABLEAU IIa. — Résultats d'une simulation de Monte Carlo (100 000 itérations). Le lait de la ferme est contaminé 360 fois au cours de la simulation (0,36 % des cas) tandis que le lait du mélange dans la fromagerie est contaminé 6 961 fois au cours de la simulation (6,961 % des cas).

Output Name	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart-type
C [cfu ml ⁻¹]	0,00	69 040,17	5,09	388,06
Log(C) si C > 0	0,03	4,84	0,97	1,03
N_f	2,00	229,00	19,87	16,71
N_{fc}	0,00	4,00	0,07	0,28
C_1 [cfu ml ⁻¹]	0,00	6 756,15	4,36	70,74
Log(C_1) si $C_1 > 0$	-2,01	3,83	-0,34	1,11
μ_{\max} [h ⁻¹]	0,01	0,11	0,07	0,02
($t-t_{lag}$) [h]	-28,57	3,28	-2,59	3,92

TABLEAU IIb. — Résultats d'une simulation de Monte Carlo (100 000 itérations). La simulation est faite uniquement sur des cas de contamination.

Output Name	Minimum	Maximum	Moyenne	Écart-type
C [cfu ml ⁻¹]	0,37	138104,92	1063,20	4570,98
Log(C) si C > 0	-0,44	5,14	0,99	1,03
N_f	2,00	218,00	19,84	16,61
N_{fc}	1,00	4,00	1,00	0,07
C_1 [cfu ml ⁻¹]	0,01	10 672,04	67,43	267,57
Log(C_1) si $C_1 > 0$	-2,28	4,03	-0,19	1,06
μ_{\max} [h ⁻¹]	0,01	0,11	0,07	0,02
($t-t_{lag}$) [h]	-28,57	3,36	-2,59	3,93
Log(C_2) si $C_2 > 0$	-2,28	4,03	-0,17	1,06
accroissement pendant le stockage	0,00	0,36	0,02	0,05
Log(C_3)-Log(C_2)				
Log(C_3) si $C_3 > 0$	-1,71	4,59	0,39	1,07
Accroissement pendant la phase de croissance	0,55	0,57	0,56	0,00
Log(C_4)-Log(C_3)				
Log(C_4) si $C_4 > 0$	-5,20	2,25	-2,34	1,19
Différence de concentration à la fromagerie	-3,20	-1,02	-2,14	0,52
Log(C_4)-Log(C_1)				

ont fourni du lait à la fromagerie (N_f) vaut 19,8 et dans 50 % des cas ce nombre (N_f) est inférieur à 15. Cependant ce nombre (N_f) peut être beaucoup plus élevé dans le cas d'une grande production à la fromagerie alimentée par des petites fermes et donc augmenter la probabilité d'avoir une ou plusieurs fermes fournissant du lait contaminé (N_{fc}) au moment de la collecte. La probabilité d'avoir dans la fromagerie du lait contaminé par une ferme vaut : $P(N_{fc} = 1) = 0,0648$, et par plusieurs fermes vaut :

$P(N_{fc} > 1) = 0,0052$. Le *tableau IIb* indique une moyenne des concentrations de *Listeria monocytogenes* dans le lait de la ferme qui vaut 5,09 cfu/ml. Les estimations des concentrations de *Listeria monocytogenes* obtenues aux différentes étapes uniquement à partir de cas de contaminations sont présentées dans le *tableau IIa*.

La moyenne de la concentration de *Listeria monocytogenes* dans le lait contaminé d'une ferme vaut 1 063 cfu/ml, pourtant d'après la simulation, dans 85 % des cas cette moyenne est inférieure à 11,3. La répartition est basée sur deux types de contaminations et est caractérisée par 85 % de contaminations peu élevées (inférieures à 11,3 cfu/ml) et 10 % de contaminations importantes (supérieures à 7 600 cfu/ml).

L'évolution de la concentration de *Listeria monocytogenes* dans la fromagerie dépend dans notre modèle de la concentration initiale de bactéries, des conditions de stockage du lait (durée, température) et de la température maximum de chauffage. Le résultat de la simulation indique une croissance de la population de *Listeria monocytogenes* dès la période de stockage dans 25 % des cas ($P((t-t_{lag}) < -0,3) = 0,75$). En effet, le temps de latence estimé par le modèle secondaire de croissance est supérieur à la durée de stockage pour des températures inférieures ou égales à 14 °C. Après le stockage du lait, au début du chauffage, la concentration de *Listeria monocytogenes* augmente jusqu'à ce que la température atteigne 45,5 °C. Puis débute la phase de décroissance qui sera d'autant plus importante que la température maximale de chauffage sera élevée (*fig. 4*). En effet, le lait est chauffé à une température de 52-54 °C. La distribution de la concentration de *Listeria monocytogenes* dans le fromage à la mise sous presse dans la fromagerie ($\text{Log}(C_4)$), est restée influencée par le type de contamination initiale (*fig. 5*). Néanmoins, le procédé de fabrication a entraîné une baisse importante de la concentration de bactéries. La baisse calculée pour le niveau de la fromagerie est de l'ordre de 1,5 à 3,2 Log cfu/ml.

La concentration de *Listeria monocytogenes* dans le fromage mis sous presse ($\text{Log}(C_4)$) calculée à partir de 100 000 cas de contaminations n'est alors que de 4,6 bactéries par kg en moyenne (Moyenne ($\text{Log}(C_4)$) = -2,34). De plus, les résul-

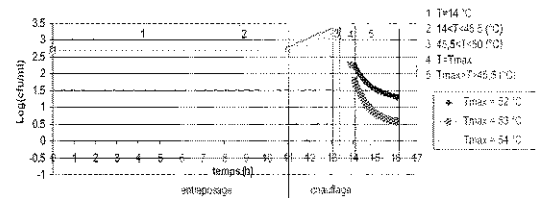


FIG. 4. — Description de l'évolution à la fromagerie d'un cas de contamination par du lait de type mammité à *L. monocytogenes* pour 3 différentes températures maximales de chauffage (T_{max}).

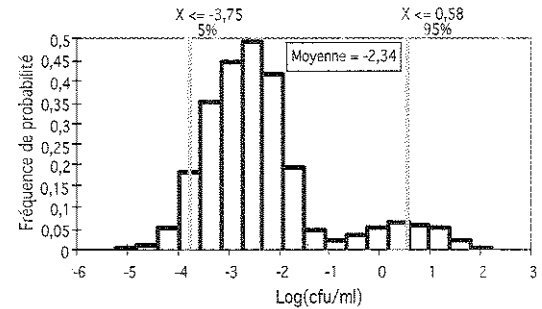


FIG. 5. — Résultat de la simulation (100 000 itérations) portant sur des cas de contaminations : la distribution de la concentration de *L. monocytogenes* avant la mise sous la presse du fromage reste toujours influencée par l'évolution de la contamination.

tats de la simulation portant sur les cas de contamination donnent $P(\text{Log}(C_4) < -0,42) = 0,9$ et $P(\text{Log}(C_4) > 0,58) = 0,05$. Selon cette simulation, la probabilité de détecter plus de 3,8 cfu de *Listeria* endommagées par la chaleur/g de masse fromagère serait de 0,05 et une charge maximale de bactéries pourrait théoriquement atteindre 356 ufu/g. Mais des inoculations artificielles de 4×10^4 bactéries/ml de lait n'ont pas pu être détectées un jour après la fabrication du fromage [2].

DISCUSSION

Connaissant les variations de température et de pH caractéristiques de la fabrication du fromage suisse au lait cru et à pâte dure de type Emmental, il a été possible d'appliquer les modèles de microbiologie prévisionnelle à une concentration de bactéries déterminée à chaque itération du modèle, et donc de suivre l'évolution de la concentration de *Listeria monocytogenes* à la fromagerie dans les cas de contaminations

survenues à la ferme. Les résultats de la simulation montrent une probabilité de 0,07 de fabriquer du fromage à partir de lait contaminé, alors que la probabilité d'avoir dans la fromagerie du lait contaminé par deux à quatre fermes n'est plus que de 0,0052, probabilité qui est donc très faible. Les concentrations élevées de *Listeria monocytogenes* sont dues aux contaminations du lait par une mammité. La moyenne des concentrations de *Listeria monocytogenes* dans le lait de citerne à la ferme (C) baisse à la fromagerie (C₁) à 4,46 cfu/ml ; cette baisse est due au mélange de lait. Ces chiffres ont été calculés à partir des cas de non-contamination et des cas de contamination. Dans 99,64 % des cas, il n'y a pas de contamination et la concentration dans le lait de citerne à la ferme (C) est de zéro. En Suisse, on a observé dans des échantillons de lait cru 0-3 *Listeria monocytogenes*/ml [Spahr U. Station Fédérale de Recherches Laitières. Communication personnelle]. Le temps de latence (t_{lag}), estimé par le modèle secondaire de croissance, est supérieur à la durée de stockage pour des températures inférieures ou égales à 14 °C. Cette supposition est étayée par 39 souches différentes de *Listeria monocytogenes*, dont les phases de latence, déterminées à 10 °C, peuvent durer de 36,5 à 68,9 heures [4]. Elles peuvent cependant être inexistantes pour les mammites dues à *Listeria monocytogenes*, étant donné que ces souches sont adaptées au lait. Grâce aux conditions de température et de pH dans la fabrication, la contamination moyenne baisse à 4,6 *Listeria monocytogenes*/kilo de fromage d'Emmental Suisse mis sous presse. Cette baisse importante semble être le résultat principalement de la température de chauffage, et la faible valeur du pH dans le fromage mis sous presse aurait un effet bactériostatique sur les bactéries endommagées par la chaleur. Ces résultats sont confirmés par les résultats d'une étude menée dans notre station de recherches laitières sur la survie de bactéries potentiellement pathogènes dans le fromage à pâte dure à base de lait cru : les *Listeria monocytogenes* inoculées artificiellement n'ont pas pu être détectées dans les fromages à pâte dure expérimentaux un jour après leur fabrication et toutes les déterminations subséquentes réalisées pendant les 120 jours d'affinage du fromage étaient exemptes de *Listeria monocytogenes* [2]. Ces résultats expérimentaux ayant été obtenus à partir de lait inoculé même avec une

concentration de 4×10^4 bactéries/ml de lait, on suppose qu'ils sont aussi valables pour les concentrations de *Listeria monocytogenes* escomptées dans le lait cru suisse utilisé pour la fabrication de fromage. En conclusion, la pâte du fromage de type Emmental suisse est exempte de *Listeria monocytogenes* après la fabrication artisanale et la durée d'affinage. D'éventuelles contaminations du fromage pendant l'affinage sont toujours possibles, elles ne concernent cependant que la croûte du fromage. Théoriquement, et en dépit des mesures de précautions prises, une contamination sur la surface de coupe au moment de la coupe du fromage serait possible. En pratique cependant, cette contamination n'a pas pu être observée dans le cas d'une contamination de la croûte très élevée (3 000 cfu *L. innocua*/100 cm²) et des essais confirment que *Listeria monocytogenes* ne se multiplie pas sur la surface de coupe [18]. Cette contamination croisée n'a pas de conséquences pour les consommateurs étant donné que celle-ci est extrêmement rare, grâce entre autres aux analyses microbiologiques effectuées et aux traitements appliqués à la surface des fromages. On peut cependant envisager une contamination croisée locale par un certain nombre de *Listeria monocytogenes*, se situant aux alentours de 1-10, que pourrait ingérer un consommateur en consommant la portion contaminée. Vu que la bactérie ne se multiplie pas sur la surface de coupe et que la dose infectante minimale n'est pas connue mais estimée à $> 10^3$ de *Listeria monocytogenes*, les possibilités réelles de contracter une listériose, soit par la consommation de croûte, soit en raison de conditions hygiéniques déplorable dans les réfrigérateurs des consommateurs présentant une déficience ou une diminution des défenses immunitaires surtout, sont minimales [18-19]. Les analyses microbiologiques de 88 fromages suisses à pâte dure se sont révélées exemptes de *Listeria monocytogenes* [20]. Selon les données disponibles et les estimations qualitatives, le nombre ingéré de *Listeria monocytogenes* dans une portion de fromage contaminé serait beaucoup plus bas que les niveaux de contamination normalement publiés (10^4 à 10^9) dans le cas d'épidémies ou de cas sporadiques de listériose [21]. Les risques de morbidité ou de mortalité dus à la consommation d'une portion normale de fromage suisse à pâte dure au lait cru de type Emmental

contaminé par 1 à 10 *Listeria monocytogenes* par portion sont extrêmement faibles. Les estimations moyennes pour différents types de fromages âgés se situent de $2,9 \times 10^{-10}$ à $3,2 \times 10^{-13}$ à l'intérieur des sous-groupes au sein de la population [21]. Étant donné que différents types de fromages avec différents processus de fabrication ont été pris en compte, ces estimations sont vraisemblablement trop élevées pour le fromage d'Emmental suisse de fabrication artisanale.

REMERCIEMENTS : Nous tenons à remercier J.-Ch. Augustin, J. Meyer, W. Luginbühl et J. Rüfenacht pour nous avoir éclaircis sur des points précis de cette étude.

RÉFÉRENCES

- Slutsker L, Schuchat A. Listeriosis in Humans. In : Ryser E, Marth E (eds). *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 2nd ed. New York, Marcel Dekker Inc, 1999: 75-95.
- Bachmann HP, Spahr U. The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semi-hard cheeses made from raw milk. *J Dairy Sci* 1995; 78: 476-83.
- Bemrah N, Sanaa M, Cassin MH, Griffiths MW, Cerf O. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prev Vet Med* 1998; 37: 129-45.
- Lou Y, Yousef E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In : Ryser E, Marth E (eds). *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 2nd ed. New York, Marcel Dekker Inc, 1999: 131-224.
- Vose DJ. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *J Food Prot* 1998; 61: 640-8.
- Sanaa M, Audurier A, Poutrel B, Menard JL, Serieys F. Origin of bovine milk contamination by *Listeria monocytogenes*. *Int Dairy Fed* 1996; 25: 163-79.
- Vose D. Risk analysis. A quantitative guide. 2nd ed. Chichester, West Sussex, John Wiley & Sons Ltd, 2000.
- Anonymous. Ergebnisse der Mitgliederumfrage Ende 1996. Union Suisse des Achetes de Lait, Brunnmattstrasse 21, Case postale, 3001 Bern, Switzerland : 1997; 1-24.
- Van Impe JF, Nicolai BM, Martens T, De Baerdemaeker J, Vandevalle J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2901-9.
- Augustin JC. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse du diplôme de Doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I, 1999.
- McMeekin TA, Olley JN, Ross T, Ratkowsky DA. Predictive Microbiology : Theory and Applications. Taunton, England, Research Studies Press LTD, 1993.
- Rosso L. Quantification et prévision du comportement dynamique des populations microbiennes. Applications à la sécurité des aliments. Mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches, Université de Paris-Sud, 1998.
- Augustin JC, Carlier V. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 2000; 56: 29-51.
- van Gerven SJC, te Giffel MC, van't Riet K, Beumer RR, Zwietering MH. Stepwise quantitative risk assessment as tool for characterization of microbiological food safety. *J Applied Microbiol* 2000; 88: 938-51.
- International Dairy Federation. Dictionary of Dairy Terminology. 2nd rev ed. Brussels, Intern Dairy Federation, 1996.
- Baranyi J, Roberts TA. Review Paper. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* 1994; 23: 277-94.
- Kaufmann U. Comportement de *Listeria monocytogenes* pendant la fabrication de fromage à pâte dure. *Revue Suisse Agric* 1989 ; 22 : 5-9.
- Kaufmann U. Spreading and growth of *Listeria monocytogenes* on the cut surface of contaminated semi hard cheese. Proceedings of the international conference on listeria and food safety. Laval, 1991: 210.
- Notermans S, Barendsz, A W, Rombouts S. The evolution of microbiological risk assessment. In : Brown M, Stringer M (eds). Microbiological risk assessment in food processing. Cambridge, Woodhead Publishing Limited, 2002: 5-43.
- Breer C. Occurrence of *Listeria* spp. in different foods. WHO Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva, 1988: 15-8.
- DHHS/FDA/CFSAN Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for food safety and applied nutrition, food and drug administration, U.S Department of health and human services, and food safety inspection service. U.S. Department of agriculture. USA: 2001.