



**COMITE SCIENTIFIQUE DE L'AGENCE FEDERALE POUR
LA SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

AVIS 39-2006

Objet : Critères d'hygiène des procédés en ce qui concerne le nombre de colonies aérobies, les *Enterobacteriaceae* et *Salmonella* (dossier Sci Com 2006/11)

Le Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire,

Vu la loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Vu l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire ;

Considérant le règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire, validé par le Ministre le 27 mars 2006;

Vu la demande d'avis de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire concernant les critères d'hygiène des procédés en ce qui concerne le nombre de colonies aérobies, les *Enterobacteriaceae* et *Salmonella*;

Considérant les débats menés lors des séances plénières des 10 mars, 23 juin et 8 septembre 2006;

émet l'avis suivant :

INTRODUCTION

Le Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires fixe notamment des critères d'hygiène des procédés. Les critères d'hygiène des procédés indiquent l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production. Ces critères ne sont pas applicables aux produits mis sur le marché. Ils fixent une valeur indicative de contamination dont le dépassement exige des mesures correctives destinées à maintenir l'hygiène du procédé conformément à la législation sur les denrées alimentaires.

En ce qui concerne les carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés, les critères d'hygiène des procédés suivants ont été fixés pour le stade après l'habillage, mais avant le ressuage :

- Nombre de colonies aérobies : $m = 3,5 \log \text{ufc/cm}^2$, $M = 5,0 \log \text{ufc/cm}^2$ (log moyen quotidien);
- *Enterobacteriaceae* : $m = 1,5 \log \text{ufc/cm}^2$, $M = 2,5 \log \text{ufc/cm}^2$ (log moyen quotidien);
- *Salmonella* : absence sur la partie examinée de la carcasse, $n = 50$, $c = 2$.

En ce qui concerne les carcasses de porcs, les critères d'hygiène des procédés suivants ont été fixés pour le stade après l'habillage, mais avant le ressuage:

- Nombre de germes aérobies : $m = 4,0 \log \text{ufc/cm}^2$, $M = 5,0 \log \text{ufc/cm}^2$ (log moyen quotidien);
- *Enterobacteriaceae* : $m = 2,0 \log \text{ufc/cm}^2$, $M = 3,0 \log \text{ufc/cm}^2$ (log moyen quotidien);
- *Salmonella* : absence sur la partie examinée de la carcasse, $n = 50$, $c = 5$.

Pour la détermination du nombre de colonies aérobies et des *Enterobacteriaceae*, on peut appliquer la méthode d'échantillonnage destructive ou la méthode non destructive, comme décrit dans la norme ISO 17604. Les valeurs limites susmentionnées sont toutefois uniquement valables pour les échantillons prélevés via la méthode destructive. Pour la détermination de *Salmonella*, il faut procéder à l'échantillonnage à l'aide d'une éponge abrasive.

TERMES DE REFERENCE

Les questions suivantes sont posées au Comité scientifique.

1. Quelle méthode est préférable pour l'échantillonnage de carcasses de bovins, d'ovins, de caprins, d'équidés et de porcs : la méthode d'échantillonnage destructive ou la méthode non destructive ?
2. Quelles sont les valeurs limites à appliquer pour le nombre de colonies aérobies et les *Enterobacteriaceae* dans le cas d'une méthode d'échantillonnage non destructive?
3. Est-ce que pour l'échantillonnage en vue de la détection de salmonelles la méthode à l'aide de l'éponge abrasive imposée par le Règlement peut être remplacée par un échantillonnage à l'aide de disques d'ouate? Est-ce que cela donne des résultats équivalents?

AVIS

1. Méthode d'échantillonnage destructive contre méthode non destructive

Comme on l'a signalé ci-avant, l'échantillonnage peut se faire soit par la méthode destructive soit par la méthode non destructive décrite dans la norme ISO 17604. Dans le cas de la méthode destructive, un échantillon de tissu est découpé à la surface de la carcasse, tandis que dans la méthode non destructive, un frottis (écouvillonnage) est prélevé de la surface de la carcasse. De nombreuses études scientifiques comparant les deux méthodes ont déjà été effectuées. En annexe au présent avis, on donne un bref aperçu de la littérature scientifique récente concernant ce sujet, et on présente un résumé des principales conclusions.

Avec la méthode destructive, à peu près toutes les bactéries présentes à la surface de la carcasse sont récupérées. Ceci se traduit par des dénombrements plus élevés que dans la méthode non destructive. Les dénombrements sont généralement moins variables que ceux obtenus sur base de la méthode non destructive. En revanche, dans la méthode destructive on n'échantillonne qu'une surface limitée. La méthode prend également beaucoup de temps et requiert une certaine habileté, ce qui la rend moins adéquate pour les tests de routine. De plus, la carcasse est abîmée et perd donc de la valeur.

Dans le cas de la méthode non destructive, on ne récupère qu'une fraction des bactéries présentes à la surface de la carcasse, ce qui se traduit par des dénombrements plus faibles et plus variables. Comme on échantillonne généralement une surface plus grande, cette méthode convient mieux que la méthode destructive pour la détection de bactéries ne figurant qu'en faibles nombres et réparties de façon inégale sur la surface de la carcasse.

Les deux méthodes ont donc des avantages et des inconvénients. Toutes deux entrent en considération pour l'échantillonnage de carcasses dans le cadre du contrôle des critères d'hygiène des procédés selon le Règlement. Le Comité scientifique souhaite cependant souligner que quelle que soit la méthode choisie, cette méthode doit être bien standardisée, afin que l'éventuelle variabilité soit réduite à un minimum et que les résultats puissent être bien comparés entre eux. Si on opte pour l'utilisation des écouvillons, il est préférable d'utiliser de grands disques d'ouate cosmétiques.

2. Valeurs limites pour les colonies aérobies et les *Enterobacteriaceae* dans la méthode d'échantillonnage non destructive

En fixant les valeurs limites pour les colonies aérobies et les *Enterobacteriaceae* dans la méthode non destructive, il faut tenir compte de la fraction de cellules récupérées par rapport à la méthode destructive. Cette fraction est essentiellement déterminée par la mesure dans laquelle les bactéries adhèrent à la surface de la carcasse. Cette adhérence est influencée par différents facteurs, comme le type de carcasse (espèce animale), le type de tissu, l'espèce bactérienne, le niveau de contamination, le degré d'humidité, le moment d'échantillonnage (par ex. avant ou pendant le refroidissement), ...

Les fractions de cellules mentionnées dans la littérature qui sont récupérées avec la méthode non destructive par rapport à la méthode destructive sont très diverses (voir également l'étude de la littérature en annexe). Dans ce contexte, on fait souvent référence à la Décision 2001/471/CE de la Commission¹ qui indique que la partie de la flore totale qui est récupérée par échantillonnage avec des écouvillons est en moyenne de seulement 20 % (voire moins) de la flore totale de la surface de la carcasse. Dans l'article synoptique de Capita et al. (2004), une valeur moyenne de 50 % est mentionnée pour la technique d'écouvillonnage humide / sec (appliquant successivement un écouvillon humide et un sec). Le Comité scientifique propose que pour toutes les espèces animales concernées et pour les deux paramètres (colonies aérobies et *Enterobacteriaceae*), l'on parte d'une fraction de cellules récupérées qui est environ 0.5 log (20-50%) plus basse que le nombre de cellules qui aurait été

¹ Décision de la Commission du 8 juin 2001 établissant les règles applicables au contrôle régulier de l'hygiène générale effectué par les exploitants dans les établissements conformément à la directive 64/433/CEE relative aux conditions de production et de mise sur le marché de viandes fraîches et à la directive 71/118/CEE relative à des problèmes sanitaires en matière d'échanges de viandes fraîches de volaille (2001/471/CE).

obtenu avec la méthode destructive. De cette manière, les valeurs limites suivantes sont obtenues, chaque fois inférieures d'une demi-unité log à la valeur limite initiale. Ces valeurs limites sont seulement valables pour l'application de la méthode de l'écouvillonnage.

En ce qui concerne les carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés, pour le stade après l'habillage, mais avant le ressuage:

- Nombre de colonies aérobies : $m = 3,0 \log \text{ ufc/cm}^2$, $M = 4,5 \log \text{ ufc/cm}^2$ (log moyen quotidien);
- *Enterobacteriaceae*: $m = 1,0 \log \text{ ufc/cm}^2$, $M = 2,0 \log \text{ ufc/cm}^2$ (log moyen quotidien).

En ce qui concerne les carcasses de porcs pour le stade après l'habillage, mais avant le ressuage:

- Nombre de colonies aérobies : $m = 3,5 \log \text{ ufc/cm}^2$, $M = 4,5 \log \text{ ufc/cm}^2$ (log moyen quotidien);
- *Enterobacteriaceae*: $m = 1,5 \log \text{ ufc/cm}^2$, $M = 2,5 \log \text{ ufc/cm}^2$ (log moyen quotidien).

Le Comité scientifique conseille également, au cas où des résultats sont éventuellement inférieurs à la limite de détection, de les assimiler dans le calcul du log moyen quotidien à la valeur de la limite de détection divisée par 2, afin d'éviter que la moyenne ne soit faussée (Hutchison et al., 2005).

Enfin, Le Comité scientifique souhaite faire remarquer qu'*Escherichia coli* doit être privilégié par rapport aux *Enterobacteriaceae* comme un indicateur d'hygiène plus spécifique pour l'échantillonnage de carcasses (cfr. Avis 44-2001 du Comité scientifique). La présence d'*E. coli* est toujours l'indice d'une contamination fécale et indique la présence possible d'autres pathogènes fécaux (taxonomiques – écologiques – physiologiques). En outre, la méthode d'analyse pour *E. coli* est plus facilement reproductible que celle pour les *Enterobacteriaceae*.

3. Echantillonnage par la méthode de l'éponge abrasive contre échantillonnage avec des disques d'ouate pour la détection de *Salmonella*

Dans le Règlement, il est mentionné que les exploitants du secteur alimentaire peuvent utiliser d'autres procédures d'échantillonnage et d'analyse s'ils peuvent démontrer à la satisfaction de l'autorité compétente que ces procédures offrent des garanties au moins équivalentes. Il est donc possible d'effectuer une étude pour comparer entre elles les deux méthodes. Dans cette étude, les deux demi-carcasses (par ex. de 250 carcasses de porcs) devraient être échantillonnées, l'une au moyen d'un écouvillon (disque d'ouate cosmétique) et l'autre avec une éponge abrasive. Idéalement, l'étude devrait comporter au moins 50 échantillons positifs quant à la présence de *Salmonella*, pour permettre une analyse statistiquement fondée.

Il faut toutefois attirer l'attention sur le fait que dans la littérature, il est indiqué que l'utilisation de matériel ayant un caractère plus abrasif qu'un disque d'ouate donne généralement des comptages microbiens plus élevés (par ex. concernant le nombre total de germes). Plus le matériel est abrasif, plus grand sera le nombre de bactéries pouvant être récupérées sur la surface de la carcasse. On peut donc s'attendre à ce que l'échantillonnage pour la recherche de *Salmonella* au moyen d'une éponge abrasive, d'une part, et à l'aide d'un disque d'ouate d'autre part, donnera des résultats différents.

Pour le Comité scientifique,
Le Président,

Prof. Dr. Ir. A. Huyghebaert
Bruxelles, le 4 octobre 2006

Annexe

L'étude bibliographique succincte qui suit donne un aperçu de l'efficacité des différentes méthodes qui peuvent être utilisées dans le cadre du règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

Dorsa et al. (1996) ont comparé l'efficacité de plusieurs méthodes d'échantillonnage pour la détermination du nombre de colonies aérobies sur carcasses de bovins dans deux études séparées. Pour la première étude, où des carcasses non inoculées ont été échantillonnées, les quatre méthodes suivantes ont été utilisées : l'excision, un frottis à l'aide d'une beurrière, à l'aide d'une éponge et à l'aide de cotons d'ouate (sur un bâtonnet en bois). Pour la deuxième étude, dans laquelle on a prélevé des échantillons sur des découpes de carcasses préalablement contaminées en surface par des matières fécales à différents niveaux d'inoculation, les quatre méthodes suivantes ont été utilisées : l'excision, un frottis à l'aide d'une éponge, à l'aide de « griddle screen » et à l'aide de « 3M mesh ». Les matériels beurrière, « griddle screen » et « 3M mesh » sont plus abrasifs que l'éponge, elle-même plus abrasive que les écouvillons ouatés. Pour les deux études, c'est l'excision qui s'est avérée être la méthode la plus consistante et la plus efficace (donnant la plus grande récupération de bactéries), tandis que la première étude a indiqué que les écouvillonnages d'ouate étaient les moins efficaces (la plus petite récupération de bactéries). Il s'est également avéré pour les deux études que les matériaux abrasifs ont une efficacité très proche de celle de l'excision, même à un faible niveau d'inoculation. A de plus forts niveaux d'inoculation (deuxième étude), on n'a pas noté de différence statistiquement significative entre les différentes méthodes d'échantillonnage. Dorsa et al. concluent qu'à l'exception des écouvillons d'ouate, toutes les méthodes testées conviennent pour la détection de la contamination fécale. Comme l'excision demande beaucoup de temps et requiert une certaine habileté professionnelle, cette méthode est toutefois moins indiquée en pratique.

Dans une étude de Gill et Jones (1999), des carcasses de bovins et de porcs ont été échantillonnées selon quatre méthodes : l'excision, un frottis à l'aide d'une éponge (acétate de cellulose), à l'aide de gaze et à l'aide d'ouate. Il faut faire remarquer que dans le cas de l'ouate, on a fait successivement un prélèvement avec un écouvillon humide et un sec, les deux étant ensuite réunis pour l'analyse. Les analyses portaient sur le nombre de colonies aérobies, sur le nombre de coliformes et sur *Escherichia coli*. L'analyse statistique des données a démontré qu'il n'y avait pas de différence significative entre le nombre de bactéries récupérées par excision, par l'éponge ou par la gaze. Les nombres de bactéries obtenues avec l'ouate se sont, dans certains cas, avérés être plus faibles que ceux obtenus avec les trois autres méthodes, et, dans les autres cas, ils étaient tout au plus comparables aux nombres les plus faibles obtenus avec les trois autres méthodes. La différence entre le log moyen pour l'ouate et les log moyens pour les autres méthodes ne dépassait toutefois généralement pas 0.5.

Ware et al. (1999) ont évalué l'échantillonnage de morceaux de poitrine de carcasses de bovins par excision et à l'aide d'une éponge. Les morceaux de poitrine ont été inoculés avec une suspension de cellules d'*Escherichia coli* (3×10^8 ufc/ml). L'échantillonnage a été fait 30 minutes après l'inoculation, et après 24 h de réfrigération à 7°C. Les analyses effectuées sur les échantillons portaient sur le nombre de colonies aérobies, le nombre de coliformes et d'*E. coli*. Le nombre de bactéries récupérées 30 minutes après inoculation était comparable pour les deux méthodes. En revanche, le nombre de bactéries récupérées après la période de

réfrigération était significativement plus bas pour la méthode avec éponge que pour celle de l'excision.

Dans une étude de la qualité microbiologique de carcasses de bovins réalisée en Australie, Phillips et al. (2001) ont fait une comparaison entre la méthode d'excision et la méthode de l'éponge (éponge de polyuréthane). Pour le nombre total de germes, des valeurs comparables ont été obtenues en ce qui concerne le log moyen, la médiane, les 80^e et 95^e percentiles et les maxima. Les nombres de staphylocoques à coagulase positive déterminés selon les deux méthodes étaient également comparables. Par contre, avec la méthode d'excision, de plus grands nombres de *E. coli* ont été récupérés qu'avec la méthode de l'éponge.

Ransom et al. (2001) ont comparé les méthodes d'excision et de l'éponge pour la détection de *Salmonella* et le dénombrement de *E. coli* biotype I sur des carcasses de bovins. Ils n'ont pas constaté de différences significatives entre les méthodes.

Un tableau récapitulatif de Capita et al. (2004) montre les avantages et inconvénients respectifs de la méthode de l'excision et de la méthode par écouvillonnage (voir Tableau 1).

Tableau 1. Comparaison de la méthode par excision et par écouvillonnage

Méthode	Avantages	Inconvénients
Excision	Donne des dénombrements les plus fiables et les moins variables grâce à une récupération pratiquement complète des bactéries, même en cas de forte adhérence à la carcasse	Méthode destructive (baisse de valeur de la carcasse). Surface d'échantillonnage limitée. Exigeante en temps. Requiert de l'habileté. Ne convient guère pour les tests de routine.
Écouvillonnage	Pas ou peu de dommages à la surface de la carcasse. Couvre généralement une plus grande surface. Convient pour la détection de bactéries présentes seulement en faible nombre et réparties de façon inégale sur la carcasse (parce qu'une plus grande surface est souvent échantillonnée).	Résultats médiocres et variables concernant les dénombrements car seules les bactéries adhérant le moins bien à la surface sont récupérées. Le pourcentage de bactéries récupérées dépend fortement de plusieurs facteurs.

La différence de dénombrements entre les deux méthodes est essentiellement liée au degré d'adhérence des bactéries à la surface de la carcasse. Cette adhérence est influencée par de nombreux facteurs, comme le type de carcasse, le type de tissu, l'espèce bactérienne, le niveau de contamination et le degré d'humidité. Avec la technique par écouvillonnage, la récupération des bactéries est favorisée si le matériel utilisé est de nature plus abrasive. Avec les écouvillons d'ouate (peu abrasifs), une forte amélioration de la récupération peut être obtenue en utilisant successivement un écouvillon humide et un écouvillon sec.

Dans une étude sur l'utilisation de l'excision et d'écouvillons de polyuréthane pour l'échantillonnage de carcasses de bovins et d'ovins, Byrne et al. (2004) n'ont pas observé de différence significative entre les deux méthodes lors de la détermination du nombre total de germes et du nombre d'*Enterobacteriaceae*. D'après les chercheurs, le polyuréthane a un caractère plus abrasif que l'ouate, ce qui accroît son efficacité.

Miraglia et al. (2005) ont étudié la récupération de bactéries (nombre total de germes) selon la méthode de l'excision et la méthode de l'écouvillonnage (successivement un écouvillon humide et sec) pour des carcasses de bovins et de porcs. Avec les méthodes par excision, ils ont toujours obtenu des nombres significativement plus élevés. Les auteurs signalent qu'il est difficile d'établir une relation précise entre les résultats obtenus avec la méthode par excision, d'une part, et la méthode par écouvillonnage, d'autre part, car les deux méthodes présentent une grande variabilité.

Hutchison et al. (2005) ont essayé de quantifier la relation entre les résultats de l'excision et de la technique par écouvillonnage (ouate; successivement écouvillon humide et sec) en ce qui concerne le nombre total de germes sur des carcasses de bovins, d'ovins et de porcs. Les deux techniques ont été alternativement appliquées sur des carcasses successives (donc différentes). La corrélation linéaire entre les dénombrements obtenus d'après les deux techniques est toutefois très faible. D'après les auteurs, ceci peut avoir différentes causes, comme par exemple une répartition non uniforme des bactéries sur des sites d'échantillonnages identiques sur des carcasses successives.

Bibliographie

1. Byrne B., Dunne G., Lyng J., Bolton D.J. 2005. Microbiological carcass sampling methods to achieve compliance with 2001/471/EC and new hygiene regulations. *Res. Microbiol.*, 156(1), pg. 104-106
2. Capita R., Prieto M., Alonso-Calleja C. 2004. Sampling methods for microbiological analysis of read meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, 67(6), pg. 1303-1308
3. Dorsa W.J., Cutter C.N., Siragusa G.R. 1996. Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 22(1), pg. 39-41
4. Gill, C.O., Jones T. 2000. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*, 63(2), pg. 167-173
5. Hutchison M.L., Walters L.D., Reid C.-A., Avery S.M., Wilson, D., Howell M., Johnston A., Buncic S. 2005. A comparison of wet-dry swabbing and excision-sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, 68(10), pg. 2155-2162.
6. Miraglia D., Ranucci D., D'Ovidio V., Branciaro R., Severini M. 2005. Comparison between Carcass Microbial Load Recovered by Swabbing Surfaces of Different Size and Using the Reference Excision Method. *Veterinary Research Communications*, 29(Suppl. 2), pg. 339-341
7. Phillips D., Sumner J., Alexander J.F., Dutton K.M. 2001. Microbiological quality of Australian beef. *Journal of Food Protection*, 64(5), pg. 692-696
8. Ransom J.R., Belk K.E., Bacon R.T., Sofos J.N., Scanga J.A., Smith G.C. 2002. Comparison of sampling methods for microbiological testing of beef animal rectal/colonic feces, hides and carcasses. *Journal of Food Protection*, 65(4), pg. 621-626
9. Ware L.M., Kain M.L., Sofos J.N., Belk K.E., Smith G.C. Comparison of sponging and excising as sampling procedures for microbiological analysis of fresh beef-carcass tissue. *Journal of Food Protection*, 62(11), pg. 1255-1259