

Maisons-Alfort, le 18 janvier 2007

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande de création de documents de référence concernant des flores microbiennes utilisables en tant qu'indicateurs d'hygiène des procédés

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 12/07/2006 par la Direction générale de l'alimentation et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande de création de documents de référence concernant des flores microbiennes utilisables en tant qu'indicateurs d'hygiène des procédés.

Contexte

Dans le cadre de l'entrée en vigueur du Paquet hygiène en janvier 2006, l'Afssa a été saisie en fin d'année 2005 concernant le maintien d'un certain nombre de critères microbiologiques nationaux, en plus de ceux figurant dans le Règlement (CE) 2073/2005¹. L'Afssa était alors sollicitée sur des critères de sécurité relatifs à des micro-organismes pathogènes, et les avis rendus soulignaient l'intérêt d'une réflexion à mener en parallèle sur les critères indicateurs d'hygiène des procédés.

Un travail de recensement a été effectué par les administrations de tutelle pour collecter les propositions de critères indicateurs d'hygiène des procédés émanant des fédérations professionnelles. Une compilation a ensuite été effectuée par les administrations.

L'Afssa a ainsi été saisie en juillet 2006 par la DGAL et la DGCCRF sur cette thématique des critères indicateurs d'hygiène des procédés.

Trois demandes composent cette saisine :

1. demande de création de documents de référence concernant des flores microbiennes pouvant être utilisées en tant qu'indicateurs d'hygiène des procédés ;
2. demande d'avis de l'Afssa sur les critères proposés dans différents secteurs, et notamment sur l'intérêt des flores retenues et les niveaux de contamination des denrées alimentaires par des micro-organismes indicateurs d'hygiène des procédés, sur la base des propositions présentées dans un fichier Excel ;
3. demande d'instructions pour les services de contrôle (il est précisé que ces éléments feront l'objet d'une saisine ultérieure).

La réponse à cette saisine s'articulera en plusieurs temps :

- la réponse à la première demande (fiche générale sur les flores microbiennes pouvant être utilisées en tant qu'indicateurs d'hygiène des procédés), est fournie par ce document.
- un groupe de travail *ad hoc* sera créé pour répondre à la deuxième partie de la demande (avis sur les critères proposés) dès lors que de nouvelles propositions de critères sous une forme plus agrégée, demandée par courrier le 27 septembre 2006, sera fournie à l'Afssa.
- La troisième partie de la demande sera réexaminée à réception de la saisine spécifique évoquée par les administrations.

Après consultation du comité d'experts spécialisé « Microbiologie », réuni les 28 septembre, 24 octobre et 28 novembre 2006, l'Afssa rend l'avis suivant sur la première partie de la saisine :

¹ Règlement (CE) n°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

Expertise

Contexte sur la notion d'indicateurs

La DGAI et la DGCCRF souhaitent que l'Afssa rédige des documents de référence dédiés à certaines flores présentant un intérêt en tant qu'indicateur d'hygiène, en particulier pour certaines flores ou micro-organismes issus de l'arrêté du 21 décembre 1979.

Le Règlement (CE) n°2073/2005² concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires distingue les critères de sécurité des denrées alimentaires et les critères d'hygiène des procédés (CHP). La définition de ces derniers est :

« **Critère d'hygiène du procédé** : un critère indiquant l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production. Un tel critère n'est pas applicable aux produits mis sur le marché. Il fixe 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 ».

Les « **indicateurs** » ont été définis par J. Ingram en 1977 :

« Marqueurs dont la présence en un nombre donné signale que les bonnes pratiques de fabrication et de distribution ont été enfreintes ».

Dans ces définitions, il est implicitement fait référence au non-respect :

- de bonnes pratiques d'hygiène (BPH), qu'il s'agisse de programmes pré-requis (PRP) ou de programmes pré-requis opérationnels (PRPo),
- de points critiques de maîtrise (CCP), tels que des critères de produit (p.ex. acidité trop faible, activité de l'eau trop forte) ou des critères de procédé (par exemple température et/ou durée de traitement thermique trop basses, température et/ou durée d'entreposage trop élevées),

non-respect qui peut conduire à rendre l'aliment insalubre (sans affecter son innocuité) du fait :

- du développement excessif de la microflore naturelle de l'aliment
- ou du fait d'une contamination et éventuellement d'une multiplication d'une microflore d'origine environnementale ou fécale.

Certains indicateurs sont associés sans ambiguïté à un PRPo ou à un CCP et leur interprétation est facile (par exemple la concentration en phosphatase alcaline sert à vérifier la pasteurisation du lait). Mais la plupart des indicateurs témoignent de plusieurs causes à la fois. Ceci rend souvent délicate l'interprétation des résultats d'analyse.

Certains indicateurs sont des micro-organismes pathogènes pour l'homme et les animaux : ils proviennent par exemple du tube digestif, de la peau, des fosses nasales, des poumons ou des mamelles (staphylocoques à coagulase positive), du sol ou de l'eau (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*). Quand leur concentration devient élevée, ces micro-organismes provoquent des troubles digestifs, avec possible épidémie communautaire. On les utilise comme indicateurs en cherchant s'ils sont présents à une concentration faible, pour détecter de mauvaises pratiques d'hygiène qui pourraient provoquer un trouble de santé du fait :

- soit d'une croissance accompagnée de la production de substances indésirables que la cuisson ou une autre préparation culinaire n'inactive pas (par exemple entérotoxine de staphylocoques, toxine émétique de *B. cereus*),
- soit d'un non-respect de l'hygiène entre la dernière préparation culinaire d'un aliment et sa consommation.

Dans quelques cas, l'emploi de micro-organismes comme indicateurs est moins commode et/ou moins instructif que celui de leurs métabolites, toxiques ou non, ou que celui de molécules dont le comportement est analogue à celui des micro-organismes d'intérêt. Les CHP peuvent donc être basés sur la quantification ou la mise en évidence de la présence ou de l'absence, ou de la concentration, soit de micro-organismes, soit de composés chimiques.

² Règlement (CE) n°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

Les indicateurs ne devraient pas être confondus avec les « **index** », définis ainsi par J. Ingram : « *marqueurs dont la présence en nombre excédant des valeurs numériques données signale la survenance possible de pathogènes ayant une écologie semblable* ».

On notera que les indicateurs (lorsqu'ils sont bien choisis) signalent positivement le non-respect des bonnes pratiques. En revanche, on ne peut attendre des index qu'une information sur la possibilité de survenance de pathogènes. En effet, l'expérience a montré qu'il n'y avait pas de relation de proportionnalité constante et universelle entre les quantités d'index et de pathogènes. De ce fait les pathogènes peuvent être absents alors même que les index sont en nombre élevé. Inversement, les pathogènes peuvent être détectés, sans que l'indicateur le soit : cette observation paradoxale est expliquée par l'imperfection des méthodes d'analyse.

C'est pourquoi le non-respect d'un critère pour un index ne peut suffire à déclarer qu'un aliment est dangereux pour la santé, au sens de l'article 14 du Règlement (CE) 178/2002³. Le Règlement (CE) 2073/2005 utilise un index : les *Enterobacteriaceae* comme index de la présence potentielle d'*Enterobacter sakazakii*.

Plus généralement, d'autres index peuvent être utiles aux exploitants du secteur alimentaire, mais leur signification devrait être appréciée au cas par cas, atelier par atelier (exemple : *Listeria* spp. pour *L. monocytogenes*).

À ce jour, il n'existe pas d'index satisfaisant pour les virus ou les parasites.

Les qualités requises des micro-organismes indicateurs

Un micro-organisme indicateur idéal devrait (Jay 2000) :

- être présent et détectable dans les aliments dont l'hygiène des procédés doit être surveillée,
- avoir une concentration inversement corrélée à l'hygiène des procédés,
- être faciles à détecter et/ou à dénombrer et être faciles à distinguer des autres micro-organismes,
- pouvoir être détectés et/ou dénombrés rapidement, de préférence au cours de la journée de travail,
- ne pas avoir une croissance ralentie ou inhibée par le reste de la microflore.

En outre, pour la contamination fécale, les micro-organismes indicateurs devraient (Bornert 1998) :

- être présents de manière constante et spécifique dans le tube digestif de l'homme et des animaux,
- être abondants dans les matières fécales, de façon à permettre la détection de faibles contaminations,
- ne pas être capables de se multiplier dans l'eau, les aliments et le milieu extérieur,
- posséder une résistance aux traitements technologiques comparable à celle des micro-organismes pathogènes fécaux.

Aucun indicateur ne possède toutes les qualités idéales. Par ailleurs, l'efficacité d'un critère microbiologique appliqué à un lot dépend notamment du seuil de détection et de la proportion de faux-négatifs (défaut de sensibilité) et de faux positifs (défaut de spécificité) de la technique d'analyse, de la valeur de la limite microbiologique choisie, et du plan d'échantillonnage. Les critères microbiologiques traditionnellement utilisés ne sont pas particulièrement sévères : la probabilité de ne pas détecter les lots non conformes (risque du consommateur) et la probabilité de refuser les lots conformes (risque du producteur) sont élevées. Mais l'utilisation systématique de ces critères microbiologiques chez tous les producteurs, année après année, fait qu'à la longue la qualité microbiologique s'améliore. Ainsi, les critères microbiologiques qui sont décrits dans cette fiche ont depuis longtemps fait la preuve de leur utilité.

³ Règlement (CE) n°178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires

Principaux indicateurs

Le tableau suivant donne la liste des indicateurs principalement utilisés en France dans la plupart des filières alimentaires (excluant l'eau destinée à la consommation humaine), ainsi que l'interprétation qui peut être faite de leur présence, ou de leur présence en quantité excessive. Cette liste ne prétend pas à l'exhaustivité ; d'autres indicateurs pourront être envisagés à l'avenir.

Le tableau indique les méthodes d'analyses appropriées. Il s'agit des méthodes ISO associées à la norme ISO 7218⁴ lorsqu'elles existent. Les méthodes NF strictement nationales sont utilisables tant que l'AFNOR les maintient en vigueur. Les méthodes rapides validées selon la norme EN ISO 16140⁵, ainsi que les protocoles internationaux utilisés antérieurement à l'entrée en application de cette norme, sont également utilisables. Si un opérateur souhaite utiliser des méthodes autres, il lui appartient de démontrer qu'elles sont au moins équivalentes aux méthodes précédemment citées. Le protocole de la norme EN ISO 16140 est recommandé pour cette démonstration.

⁴ norme ISO 7218 « Microbiologie des aliments - Règles générales pour les examens microbiologiques »

⁵ norme EN ISO 16140 « Microbiologie des aliments -- Protocole pour la validation des méthodes alternatives »

Tableau 1 : liste des indicateurs principalement utilisés en France dans la plupart des filières alimentaires (excluant l'eau destinée à la consommation humaine)

Indicateur	Technique d'analyse	Interprétation	Principaux aliments concernés (liste non exhaustive) - commentaires
Micro-organismes aérobies croissant à 30°C ou « flore aérobie mésophile »	NF V 08-051 NF EN ISO 4833	<ul style="list-style-type: none"> Indicateur du niveau général d'hygiène et/ou flore d'altération Reflète l'histoire du produit (mauvaise gestion du couple durée/température, rupture de la chaîne du froid) Cette flore peut comprendre des bactéries qui se multiplient à la température des réfrigérateurs 	<ul style="list-style-type: none"> La plupart des produits, mais doit être interprété notamment lorsqu'une flore lactique technologique est présente, Pour les produits très faiblement contaminés, cet indicateur peut présenter un intérêt, même s'il ne renseigne pas sur la nature des défaillances observées
Bactéries lactiques croissant à 30°C	ISO 15214	<ul style="list-style-type: none"> La flore lactique entre dans la composition de la flore mésophile mais n'est pas toujours mise en évidence par la méthode de dénombrement de la flore mésophile Flore d'altération pour les produits dont la flore technologique n'en comporte pas Flore en relation avec une durée de conservation longue 	<ul style="list-style-type: none"> Il n'y a pas lieu de s'en préoccuper dans les produits fermentés Grosses pièces de viande réfrigérées sous vide ou sous atmosphère protectrice avec durée de vie de plusieurs semaines ou plusieurs mois lorsque l'analyse porte sur la surface du produit
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	NF V 04-505 ISO 13722	<ul style="list-style-type: none"> Flore d'altération, indicateur d'une contamination environnementale non maîtrisée par les traitements technologiques Se multiplie à partir de 2°C 	<ul style="list-style-type: none"> Viandes

<i>Pseudomonas</i>	NF V 04-504	<ul style="list-style-type: none"> • Flore d'altération, indicateur d'une contamination environnementale non maîtrisée par les traitements technologiques • Pour les produits sous vide ou sous atmosphère protectrice : indicateur de la présence d'oxygène (mauvais vide, fuite) • Il existe de nombreuses espèces qui se multiplient à la température du réfrigérateur • Températures cardinales : 4-42°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Viandes • Pour les viandes conservées en présence d'oxygène, cet indicateur renseigne sur les conditions de conservation ; une conservation trop longue ou des conditions inappropriées s'accompagnent d'un développement marqué de cette flore. En outre, dans le cas des viandes conditionnées sans oxygène les <i>Pseudomonas</i> révèlent bien un défaut de conditionnement (présence d'oxygène)
Levures et moisissures	XP V 08-059 NF ISO 7954	<ul style="list-style-type: none"> • Indicateur d'une contamination environnementale non maîtrisée par les traitements technologiques • Flore d'altération • Il existe de nombreuses espèces qui se multiplient à la température du réfrigérateur 	<ul style="list-style-type: none"> • Tous produits sauf fruits et légumes frais, fromages (hormis fromages frais), levain des produits de boulangerie et de viennoiserie crus. • A suivre pour les végétaux transformés
<i>Bacillus</i> au sens large	XP V 08-058 NF EN ISO 7932	<ul style="list-style-type: none"> • Indicateur d'une contamination tellurique ou environnementale non maîtrisée par les traitements technologiques • Se multiplie entre 5 et 55°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Plats mijotés à une température inférieure à 63°C (riz par exemple) • Plats cuisinés à longue conservation lorsque la chaîne de froid n'est pas respectée

<p>a - Entérobactéries croissant à 30°C (couramment et abusivement appelées enterobactéries)</p> <p>b - Coliformes croissant à 30°C (couramment et abusivement appelés coliformes totaux ou coliformes 30)</p> <p>c - Coliformes thermotolérants croissant à 44°C (couramment et abusivement appelés coliformes fécaux, thermotolérants ou coliformes 44)</p> <p>d - <i>Escherichia coli</i> possédant une bêta-glucuronidase et croissant à 44°C (couramment et abusivement appelés <i>E. coli</i>, bien qu'il existe des <i>E. coli</i> ne possédant pas de glucuronidase)</p>	<p>a. NF ISO 21528-2 ou éventuellement NF V 08-054</p> <p>b. NF V 08-050</p> <p>c. NF V 08-060</p> <p>d. NF V 08-053, NF ISO 16649-2</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Indicateurs liés principalement à une contamination fécale humaine ou animale mais aussi à une contamination environnementale, non maîtrisées par les traitements technologiques • Par ordre de spécificité fécale croissante, on note : entérobactéries croissant à 30°C, coliformes croissant à 30°C, coliformes thermotolérants croissant à 44°C, <i>Escherichia coli</i> possédant une bêta-glucuronidase et croissant à 44°C. En effet, les analyses mettant en évidence les entérobactéries croissant à 30°C, ou les coliformes croissant à 30 ou à 44°C sont insuffisamment caractéristiques d'une contamination fécale. Ainsi les légumes crus (persil, tomates, par exemple) sont habituellement porteurs de coliformes croissant à 30 ou à 44°C • <i>E. coli</i> se multiplie entre 7 et 46°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Tous produits manipulés • Bien que les entérobactéries croissant à 30°C constituent un indicateur très frustré, leur emploi comme indicateur est utile, notamment parce que sur certains produits, les indicateurs plus spécifiques (ex : <i>E. coli</i> possédant une bêta-glucuronidase et croissant à 44°C) sont en quantité extrêmement faible et donc non dénombrables. Le choix entre les entérobactéries croissant à 30°C, coliformes croissant à 30°C, coliformes thermotolérants croissant à 30°C et <i>E. coli</i> possédant une bêta-glucuronidase et croissant à 44°C est à raisonner en fonction du stade considéré des filières ainsi que du type de produits
<p>Staphylocoques possédant une coagulase</p>	<p>NF V 08-057-1 ou NF V 08-057-2 NF EN ISO 6888-1 et A1 ou NF EN ISO 6888-2 et A1</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Indicateur de contamination par le personnel (mains sales, infection de la peau, du nez ou de la gorge) ou par du lait contaminé (mammite). • Les porteurs sains sont nombreux • Se multiplie entre 7 et 45°C, ne produit pas de toxine en dessous de 10°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Tous produits manipulés

<p>a. Bactéries sulfito-réductrices cultivant en anaérobiose</p> <p>b. <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p>a. XP V 08-061 et NF ISO 15213</p> <p>b. NF V 08-056 et NF EN ISO 7937</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ces 2 indicateurs témoignent d'une contamination tellurique non maîtrisée par les traitements technologiques • <i>Clostridium perfringens</i> entre dans la composition de la flore sulfito-réductrice. Il est recommandé de rechercher toujours le même indicateur. <i>Clostridium perfringens</i> est préférable car il est normalement présent dans le tube digestif des animaux et peut induire des troubles de santé • Le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices cultivant en anaérobiose à 46°C (XP V 08-061) peut constituer une alternative au dénombrement des <i>C. perfringens</i>. • <i>C. perfringens</i> se multiplie entre 10 et 51°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Plats conservés trop longtemps entre 63 et 10°C après cuisson (langue de bœuf en sauce, volaille, légumes secs) • Produits conditionnés sous-vide à durée de vie microbiologique longue (en cas de chaîne du froid insuffisamment maîtrisée)
<p>ABVT (= Azote Basique Volatil Total) et TMA (Triméthylamine)</p>	<p>Règlement (CE) N°853/2004 du 29 avril 2004</p> <p>Règlement (CE) N°854/2004 du 29 avril 2004</p> <p>Règlement (CE) N°2074/2005 du 5 décembre 2005</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Augmente lors de la croissance bactérienne, indicateur de la fraîcheur des produits • Les valeurs retenues dans le Règlement sont des limites de rejet : il convient de se référer à d'autres valeurs pour une utilisation en tant qu'indicateur d'hygiène des procédés 	<ul style="list-style-type: none"> • Chair des poissons et céphalopodes
<p>Activité de la phosphatase alcaline</p>	<p>Arrêté du 5 février 1980 (JO du 10 avril 1980) ou NF EN ISO 11816-1 (indice de classement : V04-054-1)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Enzyme sensible à la chaleur dont l'inactivation témoigne d'une pasteurisation (chauffage pendant au moins 15 secondes à 72°C) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fromages, fromages fondus, lait et produits laitiers

Références bibliographiques

- Bornert, G. (1998) Les micro-organismes indicateurs de contamination fécale de l'eau et des aliments. *Revue de médecine vétérinaire* 149, 727-738.
- Cox, L.J., Keller, N. and Schothorst, M.V. (1988) The use and misuse of quantitative determination of Enterobacteriaceae in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Series* 1988, 237S-249S.
- Institute of Food Technologists (2001) Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce, USDA, <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3exec.html#stp> consulté le 2006-08-24
- Jay, J.M. (2000) *Modern Food Microbiology, Sixth Edition*. Gaithersburg (Maryland): Aspen Publishers.
- Jouve, J.L. (1996) *La qualité microbiologique des aliments - Maîtrise et critères. 2è édition*. Paris : Polytechnica.
- Leclerc, A., Jouve, J.-L. and Federighi, M. (2005) Critères microbiologiques : principes et évolution. In *Bactériologie alimentaire - Compendium d'hygiène alimentaire*, éd. Federighi, M. pp. 258-259. Paris : Economica.

Conclusion

Tels sont les éléments que l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments est en mesure de fournir à la Direction générale de l'alimentation et à la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, en vue d'une diffusion aux professionnels concernés.

Mots-clés : critères microbiologiques, denrées alimentaires, paquet hygiène, flores microbiennes, indicateurs d'hygiène des procédés

La Directrice générale de l'Agence française
de sécurité sanitaire des aliments

Pascale BRIAND