

Dispersion des *STEC* au sein des mêlées de steak haché

9^{èmes} journées STEAKEXPERT
Mardi 23 juin 2015



Clémence BIECHE

Jean-Christophe AUGUSTIN



Contexte

anses
alimentation, environnement, travail



Anses – Saisine n° 2010-SA-0031
Saisine(s) liée(s) n° 2008-SA-0122

Maisons-Alfort, le 11 janvier 2011

Le directeur général

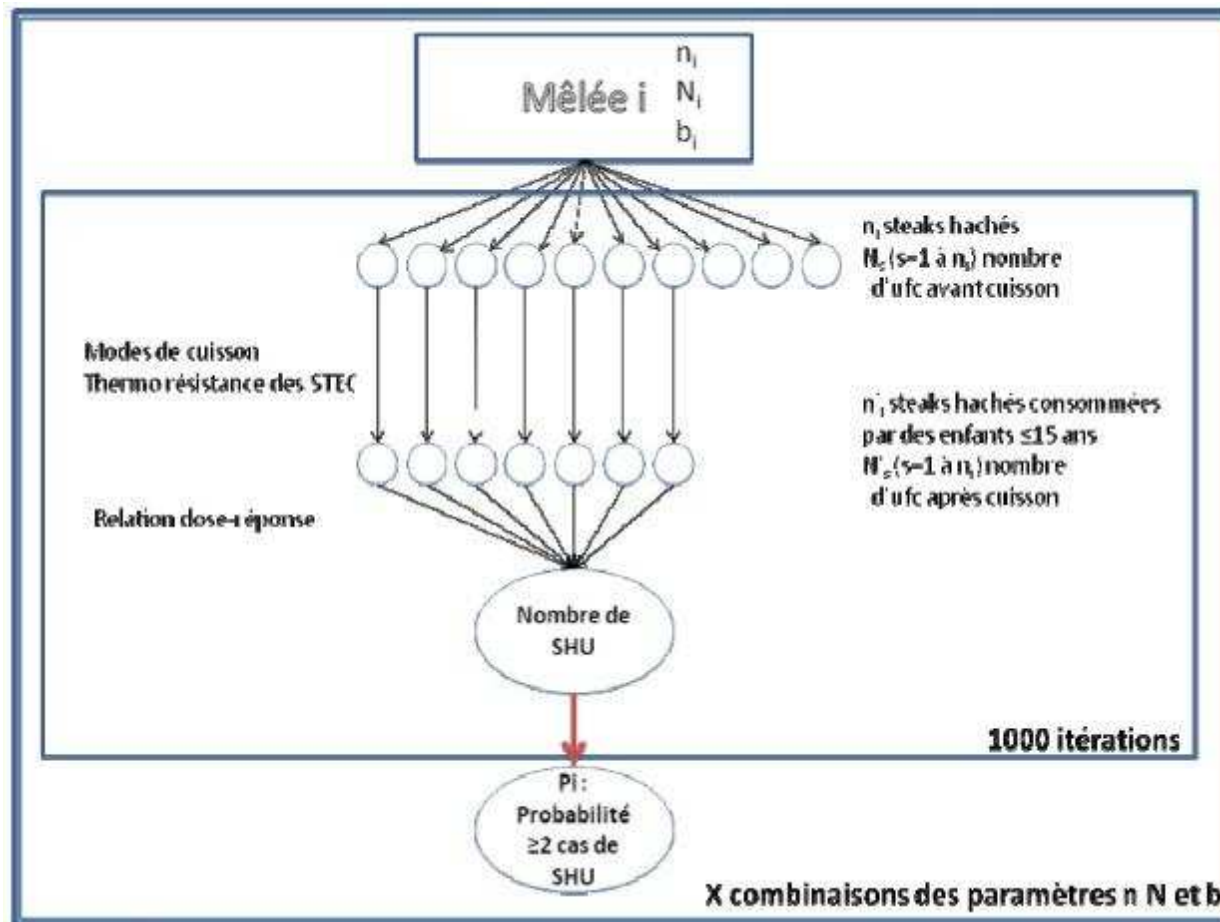
AVIS

**de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail**

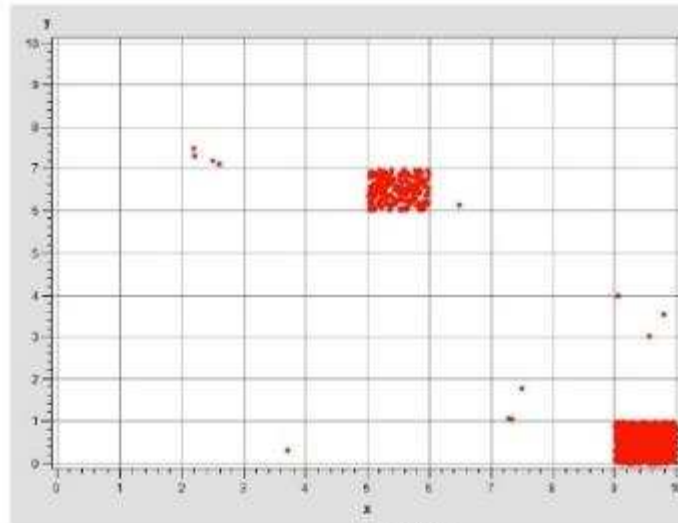
**relatif à la révision de la définition des *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) majeurs typiques,
à l'appréciation quantitative des risques liés à ces bactéries à différentes étapes de la chaîne
alimentaire, selon les différents modes de consommation des steaks hachés, et à la prise en
compte du danger lié aux *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) dans les aliments.**

Modélisation de la contamination

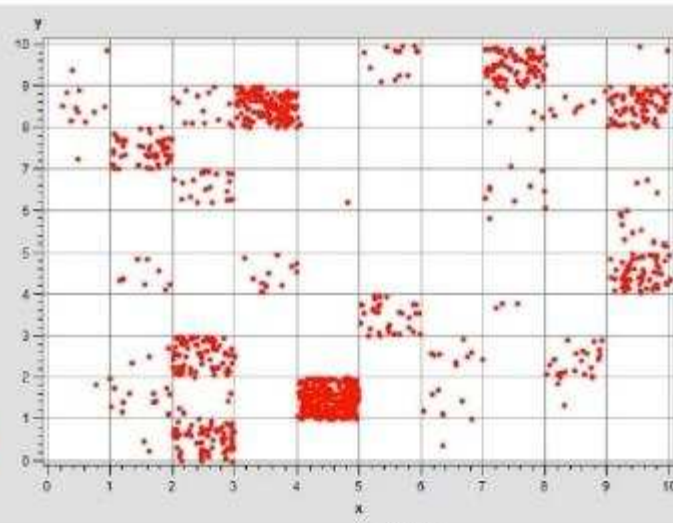
- Impact sur le risque de SHU et la détectabilité



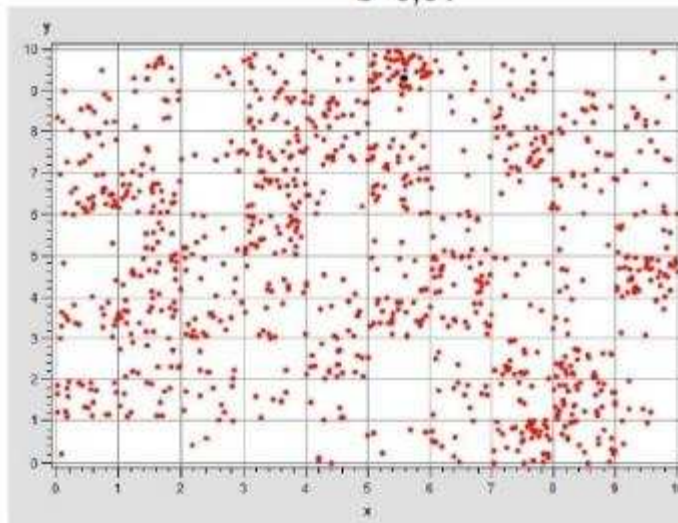
Prise en compte de la répartition des cellules bactériennes



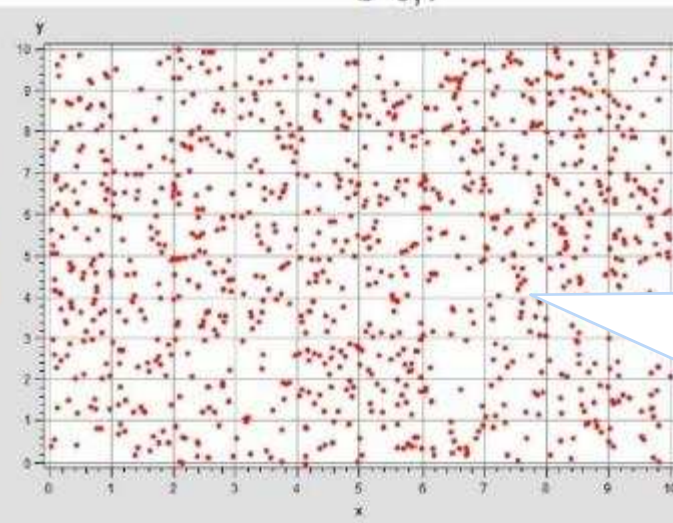
$b=0,01$



$b=0,1$



$b=1$



$b=\text{infini}$

Répartition
aléatoire
homogène =
hypothèse
classique

Efficacité échantillonnage

- ◆ Nb de prélèvements pour détecter contamination avec proba $\geq 95\%$
- ◆ 1 000 cellules (0,02 cell/g)

n	m	b=0,1	b=0,5	b=1	b=2	b=3	b=infini
Charge microbienne N = 1 000 ufc de STEC							
400	5	43	32	31	30	30	29
	10	27	17	16	15	15	14
	20	18	10	8	8	7	7
	25	16	8	7	6	6	5

- ◆ 1 000 000 cellules (1 cell/g)

n	m	b=0,1	b=0,5	b=1	b=2	b=3	b=infini
Charge microbienne N = 1 000 000 ufc de STEC							
8 000	5	8	3	2	2	2	1
	10	7	2	2	1	1	1
	20	6	2	1	1	1	1
	25	6	2	1	1	1	1

Objectifs

- ◆ **Evaluer la répartition des STEC dans les mêlées de steak haché afin d'optimiser les plans de contrôle (et l'appréciation du risque)**
- ◆ **Dispositif expérimental représentatif d'une mêlée industrielle (modèle bactérien + scénario de contamination + type de mélange)**

Dispositif expérimental

Étapes expérimentales

Choix et transformation de la souche d'étude



Mise au point du protocole d'ensemencement en conditions de laboratoire



Définition précise des facteurs étudiés et des plans d'échantillonnage



Mise au point du protocole de hachage, échantillonnage et analyse de mûées contaminées



Essais à l'échelle pilote



Analyse des résultats et conclusions



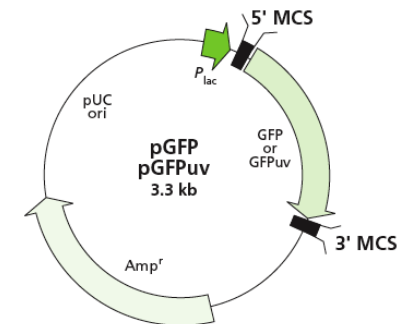
Choix et transformation de la souche d'étude

- 1) Souche ***E. coli* non pathogène** (manipulation hors laboratoire) mais **représentative des souches pathogènes STEC** retrouvées dans les viandes hachées
- 2) **Facilement détectable et dénombrable** dans la mêlée

Souche retenue : EDL 933 Δ stx pGfp AmpR

Souche d'origine responsable d'une épidémie de SHU due à la consommation de steaks hachés aux Etats Unis (1982)

- Mutation des gènes pathogènes stx (**non pathogène**)
- Insertion d'un plasmide contenant le gène gfp (**colonies fluorescentes**) et d'une cassette de **résistance à l'ampicilline**
- Vérification de la représentativité de la souche transformée par rapport aux STEC pathogènes par comparaison des cinétiques de croissance (suivi de DO) + profils de virulence et d'agrégation sur fibres musculaires (données PCR publiées dans la littérature)





Mise au point de protocoles en conditions de laboratoire

Essais réalisés sur des mêlées de 1 kg de Viandes pour Hacher (VPH)

Résultats des essais laboratoires

→ **Méthode d'inoculation retenue** : dépôt de 10 µl de suspension bactérienne à concentration maîtrisée sur un lambeau de viande (env 60 cm²), côté aponévrose (simulation d'une contamination des carcasses de type « spot »)

→ **Dénombrements des bactéries STEC marquées dans la mée** (après dilution et homogénéisation) par cultures sur géloses et par la méthode du NPP (Nombre le Plus Probable)

→ **Impact d'un stress froid à 4°C** pendant 4 jours après ensemencement de la viande : perte de viabilité (ou de cultivabilité) d'environ 1,5 log.



Définition du protocole pour essais pilotes

1/ Facteurs liés à la contamination de la mée

- ▶ Souche étudiée : **1 souche** STEC EDL 933 Δ stx pGfp AmpR
- ▶ Quantité de bactéries apportée : **niveau initial à 10 ufc/g, augmenté à 100 ufc/g**
- ▶ Forme d'apport : **dépôt de 10 μ l**, côté aponévrose (contamination spot d'un muscle)
- ▶ Durée entre l'inoculation et la mise en fabrication de la mée : **3 – 4 jours à l'origine**
(durée moyenne entre l'abattage et la mise en fabrication de viande hachée) **raccourcie à 2 heures max**

2/ Facteurs technologiques

- ▶ Taille des mées : **25 kg**
- ▶ Taux de MG : **15%**
- ▶ Présentations de la VPH : **100% frais ou mélange [1/3 surgelé * 2/3 frais]**
- ▶ Durée du mélange : **2 minutes** (paramétrage adapté au pilote)

3/ Facteurs analytiques

- ▶ Tailles des Prises d'Essai (PE) : **5 g, 25 g, 100 g**
- ▶ Nombre de PE : **60**

Protocole des essais à l'échelle pilote

Inoculation de la VPH sur 1 lambeau 2h avant fabrication
→ remis au cœur des 25 kg de VPH



Hachage primaire (granulométrie à 8 ou 10 mm)



Mélange de la mûlée primaire (4*30 seconde en changeant de sens) avec ajout de neige CO₂



Hachage secondaire (granulométrie à 3 mm) et prélèvements



- Contrôles de l'inoculation par dénombrement de spots témoins le jour de la fabrication de la mûlée (J0) et le après transport (J+1)
- Préparations des mûlées réalisées en chambre froide à 2°C avec contrôle de la température de la mûlée (mélange)

60 PE réparties sur l'ensemble de la mûlée, diluées au 1/4 en milieu liquide et envoyées au LNR pour dénombrement

→ 3 essais 100% frais + 3 essais mélange frais (2/3) * surgelé (1/3)

Protocole de dénombrement de la souche marquée dans la mêlée

X 20 échantillons par taille de PE pour chaque essai

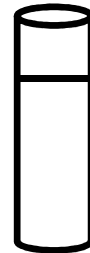
Dénombrement sur géloses

25 kg de VPH, Inoculation avec 10 ou 100 µl de suspension

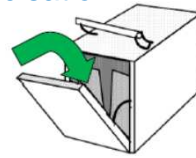
Hachage

Prélèvements 5, 25 ou 100g de mêlée (sacs stériles)

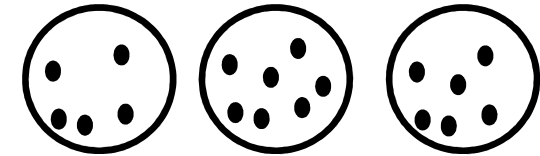
Dilution dans EPT au quart



Homogénéisation



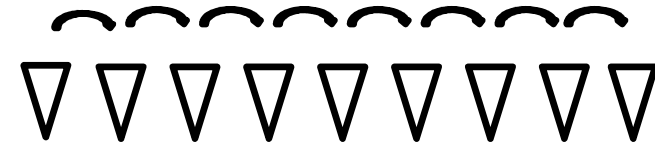
3/4 min



1 ml (3x 333 µl)
LB Agar + Amp (100 µg/ml)

X 3 soit 3 ml/ éch.

Dénombrement NPP



10⁰ 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 10⁻⁴ 10⁻⁵ 10⁻⁶ 10⁻⁷ 10⁻⁸

4ml x 5

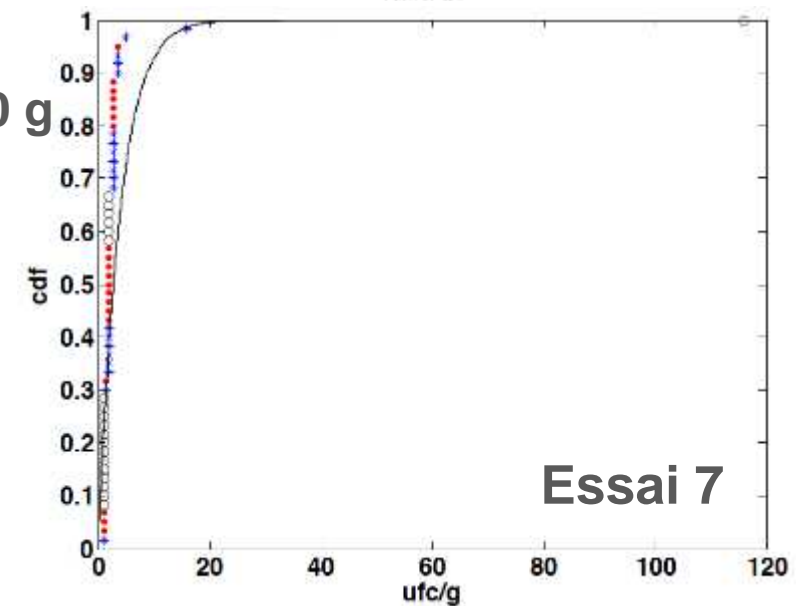
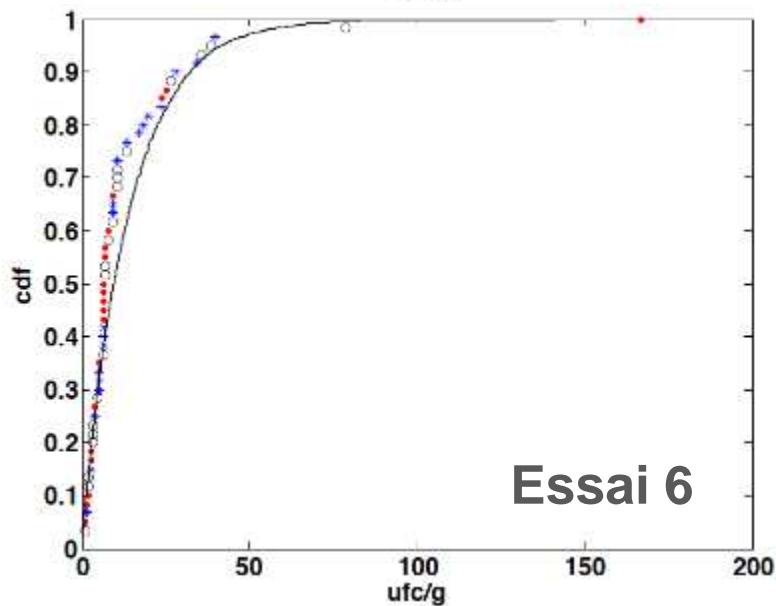
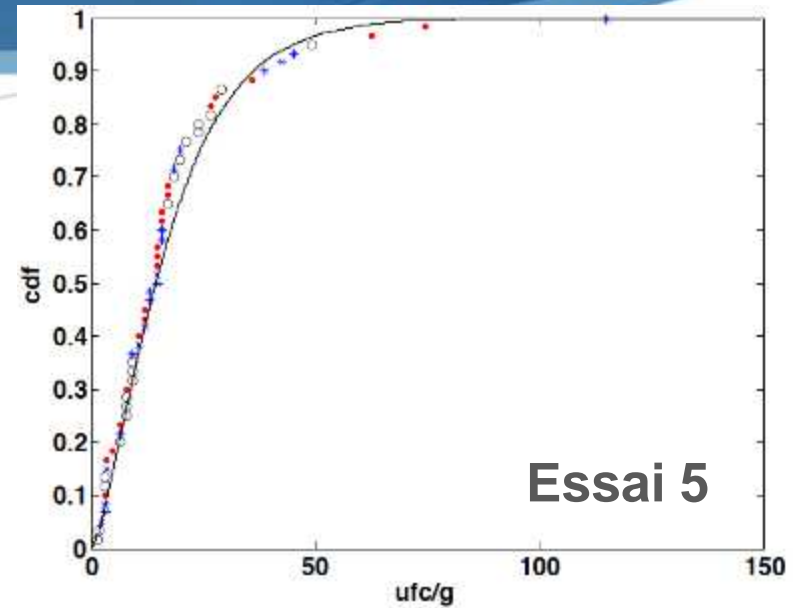
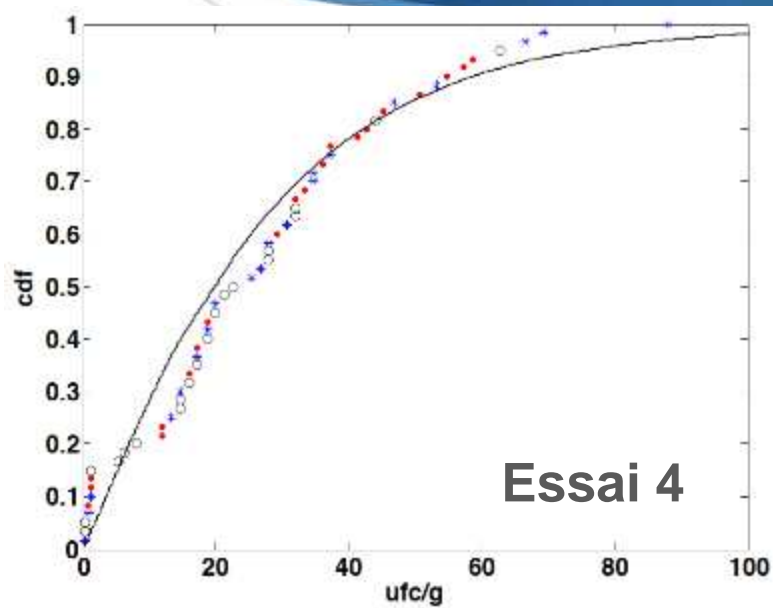
Enrichissement EPT 37°C overnight
Détection J+1

Pour chaque dilution dans EPT + Amp (100 µg/ml) :
3 à 5 enrichissements
Volume dilution utilisé/enrichissement = 4 ml

→ 2 méthodes de dénombrement de la souche marquée complémentaires

→ Evaluation des concentrations des bactéries STEC marquées recouvrées dans les différentes PE de chaque essai

Résultats – distributions d'ufc/g



noir = 5 g

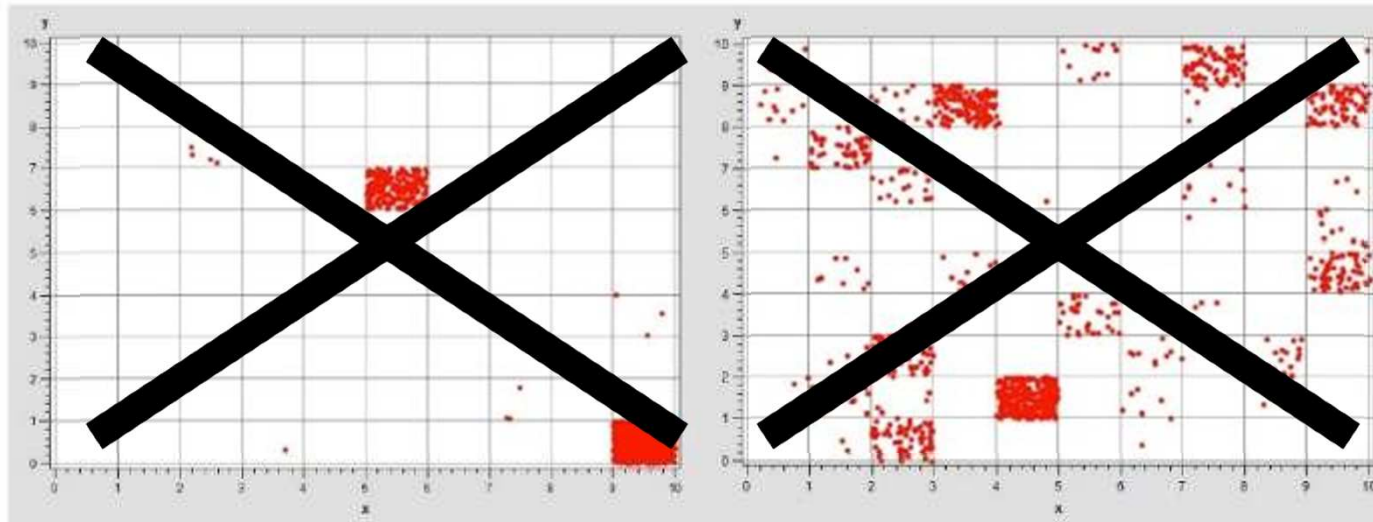
bleu = 25 g

rouge = 100 g

Résultats - Modélisation

Essais	Minerai	b	Concentration moyenne mêlée (ufc/g)		% de bactéries détectées
			Observée	Théorique	
1	Frais	1.3	0.3	9	3%
3	Frais	1.5	0.9	7	9%
4	Frais	1.1	27	96	28%
5	2/3 frais + 1/3 surgelé	1.6	18	97	19%
6	2/3 frais + 1/3 surgelé	1.0	14	89	12%
7	2/3 frais + 1/3 surgelé	1.1	4	47	9%

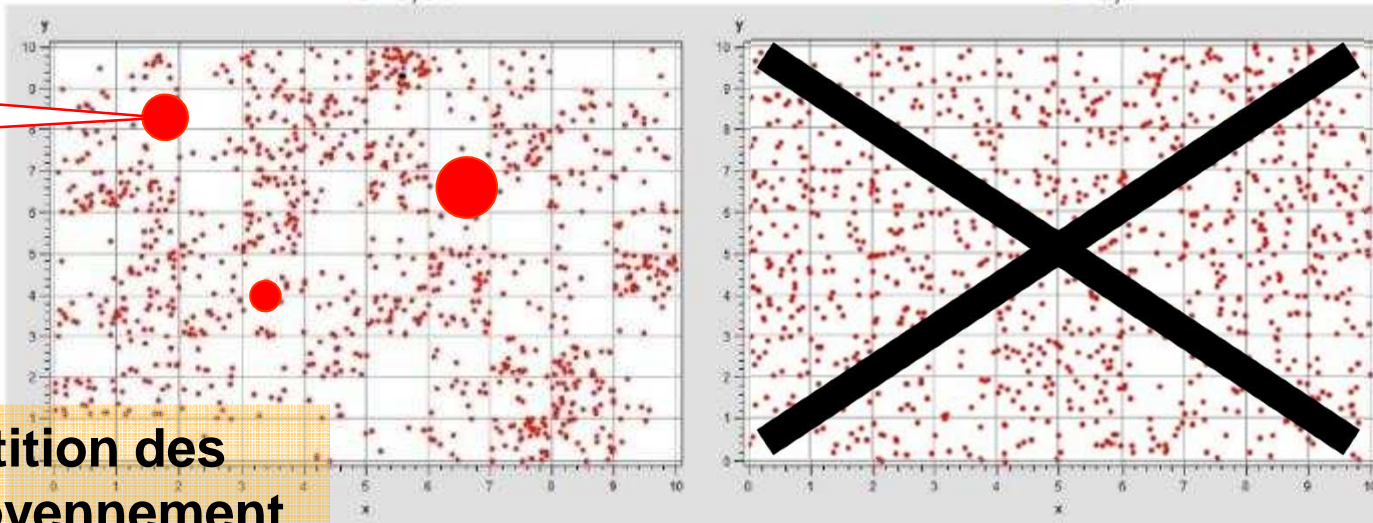
Conclusion de l'étude (dans les conditions testées)



$b=0,01$

$b=0,1$

?



$b=1$

$b=infini$

→ Répartition des STEC moyennement homogène

Conclusions sur la répartition des STEC dans les mêlées de steak haché

- ◆ Résultats obtenus à partir de la modélisation de 6 essais expérimentaux (360 prises d'essais)
 - ◆ **La répartition de la souche STEC dans la mée est moyennement homogène (b compris entre 1 et 2), avec cependant une possibilité de présence d'agrégat(s) de bactéries dans certaines zones**
- Potentiellement problématique pour quantifier précisément la contamination en STEC, mais ne remet pas en question les stratégies de contrôle

Conséquences – Détection

💧 Probabilité de détection de la contamination

Nombre d'analyses par mêlée		1			1	1	30	10
Taille des échantillons à analyser		25 g			75 g	375 g	25 g	25 g
Nombre de prises d'essai pour former les échantillons		1x25g (=25 g)	3x8g (=25 g)	5x5g (=25 g)	3x25g (=75 g)	15x25g (=375 g)	1x25g (=750 g)	1x25g (=250 g)
Concentration en STEC dans la mêlée	10 ufc/g	100	100	100	100	100	100	100
	1 ufc/g	96	100	100	100	100	100	100
	0,1 ufc/g	71	83	87	98	100	100	100
	0,01 ufc/g	20	21	22	49	96	100	89
	0,001 ufc/g	2	2	2	7	31	52	22

Merci pour votre attention

