

Risque lié à *Staphylococcus aureus* dans le jambon sec tranché

Incidence de l'activité de l'eau et de la température de conservation sur le risque de croissance de *S. aureus* dans le jambon sec tranché

Mots-clés : *Staphylococcus aureus*, Jambon sec, Température, a_w , Challenge-test, Sym'Previus, Microbiologie prévisionnelle

Auteurs: Souad Christicains¹, Catherine Denis², Aurélie Hanin², Laurent Picgirard¹

¹ Association pour le Développement de l'Industrie de la Viande (ADIV). 10, rue Jacqueline Auriol, 63039 Clermont-Ferrand, France ;

² ACTALIA-Sécurité des Aliments, 310 rue Popielujko, 50000 Saint-Lô, France.

* E-mail de l'auteur correspondant : souad.christicains@adiv.fr

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle combiné de la température de conservation et de l'activité de l'eau sur le risque de développement de *Staphylococcus aureus* dans le jambon sec tranché, conditionné sous atmosphère protectrice. Elle a permis de souligner qu'une faible activité de l'eau n'est pas suffisante pour contrôler le développement de *S. aureus* dans des jambons secs tranchés conservés à température ambiante. En effet, le développement de *S. aureus* est principalement tributaire de la température et de l'activité de l'eau en lien avec le taux de sel et la durée d'affinage des jambons.

Résumé :

La maîtrise du danger *Staphylococcus aureus* dans le jambon sec tranché est assurée par l'activité de l'eau (a_w), la teneur en sel et la température de conservation. Cependant, de nouveaux canaux de distribution impliquant un stockage à température ambiante soulèvent une question sanitaire sur la capacité de cette bactérie pathogène à croître sur du jambon sec dans ces conditions de stockage. En effet, les valeurs d' a_w de ce produit de salaison sont connues pour être très hétérogènes et dépendent de la masse musculaire, des niveaux de sel, de la déshydratation et de la durée de maturation. Le but de cette étude était d'évaluer l'impact de différentes températures de conservation (20°C, 15°C et 8°C) sur le comportement de la souche *S. aureus* MW2 inoculée sur des jambons secs tranchés avec différentes valeurs d' a_w , allant de 0,89 à 0,96 et conditionnés sous atmosphère modifiée. Dans un premier temps, des tests de croissance (challenge-tests) ont été réalisés pour évaluer la capacité de développement de *S. aureus* puis, dans un second temps, l'outil de microbiologie prévisionnelle Sym'Previus a été employé pour simuler l'impact d'une recontamination en *S. aureus* de jambons secs après désossage ou tranchage et son comportement en fonction de la température et de l'activité de l'eau. Cette étude a montré qu'indépendamment des valeurs de l' a_w , aucune croissance de la souche *S. aureus* MW2 n'a été observée à 8°C alors que la souche a pu croître à 20°C quelle que soit la valeur de l' a_w des produits. A la température de 15°C, pour des a_w supérieures à 0,94, la population staphylococcique peut augmenter jusqu'à 6,8 log₁₀ UFC/g. Cette étude intégrant des approches expérimentales et de modélisation a ainsi démontré que la conservation à froid (en dessous de 8°C) est l'obstacle le plus pertinent pour contrôler le danger de *S. aureus* dans le jambon sec tranché conditionné sous atmosphère modifiée.

Abstract: Incidence of storage temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus* in sliced dry cured ham packed under modified atmosphere

The danger of *Staphylococcus aureus* in sliced dry cured ham is controlled by water activity, salt content and storage temperature. However, new retailing channels involving storage at ambient temperature raise a sanitary question about the ability of *S. aureus* to grow on dry cured ham in those conditions. Indeed, a_w values in dry cured ham are known to be very heterogeneous depending on muscular mass location, salt levels, dehydration and ageing duration and may not be sufficient to prevent *S. aureus* growth by itself. The aim of this study was to evaluate the impact of different storage temperatures (20°C, 15°C and 8°C) on the behavior of *S. aureus* MW2 inoculated on sliced dry cured ham packed under modified atmosphere according to different a_w values ranging from 0.89 to 0.96. Challenge-testing results were then used to predict the growth of *S. aureus* on slices of dry cured ham according to a_w and storage temperature values. This study shows that, regardless of the a_w values, no growth of *S. aureus* MW2 was observed at 8°C but the strain was able to grow at 20°C whatever the a_w value. At 15°C, with an a_w value greater than 0.94, staphylococcal population can reach up to 6.8 log₁₀ CFU/g. This study involving both experimental and modelling approaches demonstrates that cold storage (below 8°C) is the most relevant hurdle for controlling the *Staphylococcus aureus* hazard in sliced dry cured ham under modified atmosphere.

INTRODUCTION

Les dangers microbiologiques liés à l'élaboration de jambons secs sont très différents en fonction de leur stade de fabrication. Lorsque le produit est entier, les risques de contamination en germes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ou *Staphylococcus aureus* ne peuvent se manifester qu'à sa surface si le jambon frais n'a pas subi de perforations pouvant être à l'origine d'une contamination par des microorganismes pathogènes depuis le contenu digestif. A l'issue du procédé de fabrication, le jambon sec peut être désossé puis tranché et son innocuité ou son aptitude à se conserver dépendent alors de ses caractéristiques physico-chimiques, et en particulier de son a_w . La réduction des teneurs en sel opérée ces dernières années pour répondre aux demandes des pouvoirs publics et des consommateurs a des répercussions sur l' a_w qui tend à augmenter et par conséquent sur la stabilité microbiologique des produits finis désossés ou tranchés (Picgirard *et al.*, 2012).

Compte tenu de leurs caractéristiques physico-chimiques en fin de fabrication (a_w proche de 0,92 et pH compris entre 5,8 et 6) et de la température de conservation actuelle de +8°C (arrêté du 21/12/2009 et note DGAL/SDSSA/N2012-8054 du 8 mars 2012), les jambons secs tranchés peuvent être exposés à différents dangers microbiologiques. Les propriétés de croissance de *Listeria monocytogenes* sont généralement incompatibles avec leurs caractéristiques physico-chimiques, mais *Salmonella* ne semblerait *a priori* pas être un danger majeur compte tenu de son a_w minimale de développement de 0,94 en moyenne (Anses, 2011). Si *S. aureus* ne représente pas de danger microbiologique au regard des températures de circuits de distribution actuels (Anses, 2011), il pourrait constituer un danger émergent dans le cadre du développement de nouveaux circuits de commercialisation à

température ambiante de jambons secs tranchés. En effet, des études relatent une forte relation entre l'activité de l'eau des produits de salaisons sèches, leurs conditions de conservation, et notamment la température de stockage, et la prévalence en *S. aureus* ou sa toxino-génèse (Rajkovic, 2012, Portocarrero *et al.*, 2002, Untermann *et al.*, 1992). Ces études montrent qu'aucune production d'entérotoxines n'est détectée dans un délai de 7 jours à +20°C dans des jambons avec une a_w de 0,920, tandis qu'elle se manifeste si la température de conservation augmente. Dans des jambons dont l' a_w est proche de 0,890, la production d'entérotoxines est détectée au bout de 7 jours de conservation à 35°C (Untermann *et al.*, 1992). Rajkovic (2012) a montré que la production de toxines peut être observée à 22°C, 37°C mais pas à 12°C, ceci indépendamment du mode de conditionnement, sous vide ou sous atmosphère protectrice. La forte dépendance de la toxino-génèse aux valeurs d' a_w des produits a également été démontrée sur des jambons secs de campagne du Kentucky (Portocarrero *et al.*, 2002).

Compte tenu de cet état des lieux, il semble important d'évaluer le risque lié à *S. aureus* dans les jambons secs élaborés selon les usages français en fonction de l' a_w et de la température de conservation. Au regard des outils désormais disponibles, le recours à la microbiologie prévisionnelle peut en plus, apporter aux professionnels la possibilité d'investiguer un champ large de combinaisons de valeurs d' a_w et de température de conservation susceptibles de permettre la croissance de *S. aureus*. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de différentes valeurs d' a_w sur le comportement de *S. aureus* dans le jambon sec tranché et de prédire la croissance de ce germe par microbiologie prévisionnelle.

I. MATERIELS & METHODES

I.1. Sélection de jambons secs à teneurs en sels différenciés

Cinq types de jambons secs (de 3,25 mois à 12 mois d'affinage) ont été sélectionnés sur une large gamme de valeurs d' a_w variant de 0,900 à 0,950 +/- 0,005 :

- des jambons de 12 mois visant des a_w proches de 0,890,
- des jambons de 7 mois pour obtenir des a_w proches de 0,915,
- des jambons de 9 mois pour obtenir des a_w proches de 0,925 / 0,930,
- des jambons de 5 mois visant une a_w moyenne de 0,935/0,940,
- des jambons de 6,5 mois pour obtenir une a_w moyenne de 0,945,
- des jambons de 3,25 mois pour obtenir des a_w élevées, supérieure à 0,95.

Une partie des jambons a été fournie par des industriels et deux catégories de jambons ont été produites spécifiquement

selon un cahier des charges établi par PYRAGENA, la station expérimentale du Consortium du Jambon de Bayonne à Arzacq (64) pour obtenir des produits avec des valeurs d' a_w élevées supérieures à 0,930 (a_w définie comme moyenne ci-dessus). Il s'agissait de jambons à teneur réduite en sel et/ou à humidité élevée. 2 types de jambons ont été fabriqués :

- Un lot de jambon avec une humidité de 62% environ (rendement technologique estimé à 78%) et un taux de sel de 4% pour viser une a_w de 0,950,
- Un autre lot de jambon avec une humidité de 57% environ (rendement technologique estimé à 72%) et un taux de sel de 4,5% pour viser une a_w de 0,935/0,940.

Pour limiter la variabilité de l' a_w , seules les sous noix de ces jambons ont été utilisées pour la réalisation des essais expérimentaux. Le Tableau 1 résume les caractéristiques des jambons étudiés et les valeurs de pH et d' a_w mesurées.

Tableau 1 : Caractéristiques des jambons étudiés et plan d'expériences

Durée de maturation	Teneur en sel estimée	Activité de l'eau moyenne (*)	pH moyen (*)	Température de conservation	Durée de conservation (**)
12 mois	7,3%	0,880 [0,876-0,882]	5,75 [5,64-5,75]	15°C	55 jours
7 mois	6,8%	0,886 [0,875-0,901]	5,69 [5,56-5,74]	15°C	45 jours
9 mois	6,5%	0,905 [0,891-0,912]	5,81 [5,70-5,95]	15°C	48 jours
9 mois	4,9%	0,921 [0,914-0,930]	5,76 [5,72-5,76]	15°C	24 jours
9 mois	4,9%	0,926 [0,920-0,930]	5,76 [5,56-5,95]	15°C	48 jours
5 mois	4,0%	0,934 [0,927-0,940]	5,92 [5,80-6,09]	15°C	27 jours
6,5 mois	4,0%	0,943 [0,929-0,957]	5,84 [5,77-5,97]	15°C	15 jours
3,25 mois	3,5%	0,960 [0,947-0,971]	5,65 [5,50-5,68]	15°C	20 jours
9 mois	6,0%	0,914 [0,903-0,924]	5,86 [5,69-5,98]	20°C	60 jours
9 mois	4,9%	0,922 [0,913-0,927]	5,76 [5,57-5,87]	20°C	27 jours
7 mois	6,2%	0,931 [0,923-0,936]	5,83 [5,71-5,96]	20°C	30 jours
5 mois	4,9%	0,939 [0,933-0,946]	5,82 [5,71-6,01]	20°C	24 jours
3,25 mois	3,5%	0,951 [0,938-0,962]	5,75 [5,71-5,81]	8°C	48 jours

(*) : Moyennes pH et a_w avec les valeurs maximales et minimales mesurées

(**) La durée de conservation est fonction de la valeur de l'activité de l'eau et de la température de conservation associée.

I.2. Mise en œuvre des tests de croissance (challenge-tests)

Des tests de croissance (challenge-tests) ont été effectués par contamination en surface des tranches des jambons secs afin de simuler une recontamination après fabrication et/ou au cours du tranchage. Les tests ont été conduits dans le respect des lignes directrices de la norme NF V 01-009 (Traçabilité et sécurité des aliments - Management et hygiène - Lignes directrices pour la réalisation des tests de croissance microbiologiques - version 2014). La contamination artificielle des tranches de jambon a été effectuée à l'aide de la souche clinique de *S. aureus* MW2, productrice d'entérotoxines A et C.

La souche conservée congelée sous forme de cryobilles (- 80°C) a été revivifiée et préparée selon le protocole de la norme NF V01-009. La mise en culture a été effectuée par repiquage de 0,1ml dans 10 ml de milieu de culture BHI (pendant 24h à 30°C). Ensuite, deux repiquages successifs ont permis d'obtenir la culture destinée à la contamination des produits (en fin de phase exponentielle ou début de phase stationnaire). Après deux centrifugations successives, les culots ont été mis en suspension dans 10 ml d'eau physiologique. Des dénombrements ont été effectués sur

milieu BHI et milieu sélectif pour *S. aureus* (RPF Rabbit Plasma Fibrinogen) et la solution bactérienne a été stockée à 4°C pendant 24h avant inoculation. Après numération, la concentration a été ajustée de façon à inoculer les tranches à raison de $2 \pm 0.5 \log \text{UFC/g}$.

L'inoculation a été effectuée par pulvérisation à la surface des tranches avec un volume de solution d'ensemencement standard sur une masse standardisée de 30 g, correspondant à 3 tranches. Le volume apporté a été calculé de manière à ne pas excéder un rapport poids/volume de 1/100, évitant ainsi une augmentation de l'activité de l'eau du produit. A noter que les témoins destinés aux mesures physico-chimiques ont été inoculés avec un volume équivalent d'eau physiologique.

Les produits inoculés ont été ensuite conditionnés sous atmosphère protectrice (70%N₂/30%CO₂) et mis en conservation à une température de 20°C, 15°C ou 8°C (Tableau 1).

Trois séries de challenge-tests ont été effectuées pour évaluer l'impact des combinaisons a_w / température.

I.3. Suivis analytiques au cours de la conservation

Pour chaque challenge-test correspondant à une condition a_w / température, des durées de stockage spécifiques ont été définies, afin d'obtenir une cinétique de croissance ou de conclure à l'absence de croissance (Tableau 1). Le dénombrement de *S. aureus* ainsi que les mesures du pH et de l' a_w sur les échantillons témoins non inoculés ont été effectués à 10 ou 11 stades, choisis en fonction du couple a_w / température. De plus, pour chaque condition, un dénombrement de *S. aureus* endogène et des bactéries lactiques a été systématiquement réalisé à J0 (après conditionnement) et à la fin de la durée de conservation définie sur les échantillons témoins.

Pour chaque condition et chaque échéance, les suivis analytiques ont été effectués selon 3 répétitions (n = 3).

I.4. Dosage des entérotoxines staphylococciques

Les toxines staphylococciques A et D ont été dosées dans quelques cas lorsque la population du germe ensemencé dépassait le seuil de 10⁵ UFC/g. En effet, dans certaines catégories de produits laitiers (règlement européen CE

Les analyses microbiologiques ont été effectuées selon les normes en vigueur. Les échantillons ont été préparés selon la norme ISO 7218 (2007) par broyage de 25 g de produit dans 225 ml d'eau peptonnée. Le dénombrement de *S. aureus* a été ensuite réalisé selon la norme NF EN ISO 6888-2 sur milieu Baird Parker supplémenté avec du RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen, Oxoid, France). Les bactéries lactiques ont été dénombrées sur milieu MRS (Man Rogosa & Sharpe, Oxoid, France) selon la norme NF ISO 15214.

La mesure de pH (norme ISO 2917) a été effectuée sur un broyat (broyage de 10g de produit dans de l'eau distillée) avec l'électrode LE 427-57 (Mettler-Toledo). L'activité de l'eau (ISO 21807) a été déterminée à l'aide de l'appareil Aqualab série 3TE sur un broyat de 30g de produit.

2073/2005), le dosage d'entérotoxines staphylococciques est requis lorsque le niveau de population de *S. aureus* excède ce taux. Cinq dosages ont été effectués. Ils ont été confiés au Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort,

unité Staphylocoques, *Bacillus*, Clostridies et Lait (SBCL), équipe Staphylocoques (LNR SCP) de l'ANSES. La méthode employée était une recherche d'entérotoxines staphylococcique par dialyse / concentration suivie d'une confirmation par ELISA quantitatif (méthode CAT BAC 16 anciennement intitulée CAT BAC.03). A titre informatif (et

pour corroborer les résultats obtenus par le test ELISA quantitatif), ces échantillons ont également été analysés par la méthode Vidas SET2, qui est un test ELFA qualitatif, permettant d'indiquer de façon globale si l'échantillon est positif en toxine staphylococcique de type A à E.

I.5. Simulations de croissance de *S. aureus* par microbiologie prévisionnelle

Les courbes de croissance obtenues par challenge-tests ont fait l'objet d'un ajustement et les paramètres de croissance déterminés ont été exploités par microbiologie prévisionnelle. Le module de croissance probabiliste Sym'Previus (www.symprevius.eu) a été utilisé afin de simuler la croissance de *S. aureus* et la probabilité de dépasser le seuil fixé de 5 log (UFC/g) en fin de conservation en tenant compte

de la variabilité des caractéristiques physico-chimiques des jambons (a_w et pH) et de la température de conservation. A noter que les modèles de microbiologie prévisionnelle disponibles ne permettent pas de simuler la toxinogénèse mais permettent d'estimer le délai nécessaire pour atteindre des niveaux de contamination susceptibles d'induire cette production de toxines.

II. RESULTATS

II.1. Résultats des analyses microbiologiques des jambons secs témoins non inoculés

Les résultats des dénombrements des bactéries lactiques et des *S. aureus* endogènes des témoins nonensemencés sont donnés dans le Tableau 2. Malgré le contrôle des produits avant la mise en œuvre des tests de croissance, un échantillon montre une présence de *S. aureus* endogène à une concentration initiale de 1,43 log UFC/g (a_w 0,914/20°C) et qui atteint en fin de conservation (J60), une population de 3,85 log UFC/g. Pour trois autres produits dans lesquels *S. aureus* n'a pas été détecté au départ (résultats inférieurs au seuil de quantification de 100 UFC/g), on note une présence

significative en fin de conservation de l'ordre de 5,67 log UFC/g (a_w 0,931/20°C), 3,61 log UFC/g (a_w 0,960/15°C) et 2,25 log UFC/g (a_w 0,939/20°C). Ces résultats soulignent d'une part, l'importance de la variabilité d'échantillonnage et d'autre part, l'impact de la température de conservation (20°C notamment) sur la croissance de *S. aureus* sur des produits naturellement contaminés. Pour ce qui concerne les bactéries lactiques, selon le lot de jambon considéré, les numérations en fin de conservation varient de <1 à 8,43 log UFC/g.

Tableau 2 : Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur des produits témoins

	Concentrations initiales (j0) (log ₁₀ ufc/g)		Concentrations en fin de conservation (log ₁₀ ufc/g)		
	<i>S. aureus</i> préssumé	Bactéries lactiques	Echéances d'analyses	<i>S. aureus</i> préssumé	Bactéries lactiques
15°C / A _w 0,880	<2	<1	J55	<2	<1
15°C / A _w 0,886	<2	<1	J45	<2	<1
15°C / A _w 0,905	<2	2,71 ± 0,43	J48	<2	1,10 ± 0,17
15°C / A _w 0,921	<2	3,42 ± 0,56	J24	<2	4,40 ± 0,56
15°C / A _w 0,926	<2	2,76 ± 0,11	J48	<2	6,54 ± 1,47
15°C / A _w 0,934	<2	4,13 ± 0,11	J27	<2	7,78 +/- 0,89
15°C / A _w 0,943	<2	2,68 ± 0,14	J15	<5	>6,48
15°C / A _w 0,960	<2	2,45 ± 0,10	J20	3,61	8,43 ± 0,05
20°C / A _w 0,914	1,43 ± 0,75	1,39 ± 0,68	J60	3,85 ± 2,50	4,15 ± 0,5
20°C / A _w 0,931	<2	<1	J30	5,67 ± 0,79	3,95 ± 0,31
20°C / A _w 0,922	<2	3,87 ± 0,10	J27	<2	7,27 ± 0,84
20°C / A _w 0,939	<2	1,61 ± 0,62	J24	2,25 ± 1,16	6,20 ± 0,44
8°C / A _w 0,951	<2	2,58 ± 0,18	J48	<2	8,35 ± 0,07

II.2. Evolution de la souche de *S. aureus* inoculée au cours de la conservation des jambons secs

Dans la première série de challenge-tests réalisés à une température de 15°C, au cours de la conservation, les résultats des dénombrements de la souche de *S. aureus* inoculée (Figure 1) montrent que des a_w inférieures à 0,890 sont de nature à inhiber la croissance de *S. aureus*. Alors que les a_w supérieures à 0,940 permettent une croissance significative du germe avec un potentiel de croissance de +1.5 log UFC/g minimum. Les valeurs d' a_w proches de la valeur de 0,920 constituent le seuil limite de croissance à la température de

15°C car on observe une croissance modérée de l'ordre de +0,5 log UFC/g.

Dans la seconde série de tests de croissance (Figure 2), les courbes de croissance obtenues montrent qu'à la température de conservation de +8°C, aucune croissance de *S. aureus* ne se manifeste même pour des a_w supérieures à 0,95. Ce résultat confirme bien que les pratiques de conservation au froid préconisées par les industriels producteurs de jambons secs tranchés ou désossés permettent de maîtriser le danger *S. aureus*. A 15°C, aucune croissance de *S. aureus* n'est

observée pour les jambons dont l' a_w vaut 0,900 / 0,910. Pour les tranches de jambons secs dont l' a_w était inférieure à 0,930, aucune croissance de *S. aureus* n'a été constatée à une température de conservation de +15°C alors qu'au cours du challenge-test (Figures 1 et 2), une croissance modérée mais non significative (+0,5 log UFC/g) avait été notée pour des jambons dont l' a_w moyenne était de 0,921 +/- 0,006. Pour ce test de croissance, un faible potentiel de croissance (+0,44 log UFC/g) a été noté à J27, échéance pour laquelle la valeur d' a_w mesurée était élevée (0,937). Ces résultats peuvent être liés à l'incertitude de mesure et/ou à la variabilité de l'échantillonnage en termes d' a_w et de la population des bactéries lactiques endogènes. Par contre, à température de +20°C, on observe une forte croissance de *S. aureus* dans la plage d' a_w de la référence de 0,920/0,930 avec un potentiel de

croissance de plus de 3 log UFC/g. Pour confirmer ce dernier résultat, la dernière série de challenge-tests a été menée sur d'autres lots de jambons à la température de 20°C pour des valeurs d' a_w proches de la valeur moyenne ($a_w = 0,920$) soit 0,914, 0,929 et 0,937. Les résultats donnés dans la Figure 3 confirment cette forte croissance, très rapide dès les premiers jours de conservation et qui dépasse les 5 log UFC/g en fin de durée de conservation. La température et l' a_w ont un impact très significatif sur la croissance de *S. aureus* et des valeurs d' a_w supérieures à 0,910 / 0,920 comme une température de +20°C, sont favorables à une croissance rapide de *S. aureus* qui doit être considéré comme un réel danger microbiologique pour les jambons secs commercialisés à température ambiante.

Figure 1 : Evolution relative (en delta log UFC/g) des populations de *S. aureus* (souche MW2) en fonction de l' a_w des jambons secs conservés à une température constante de 15°C

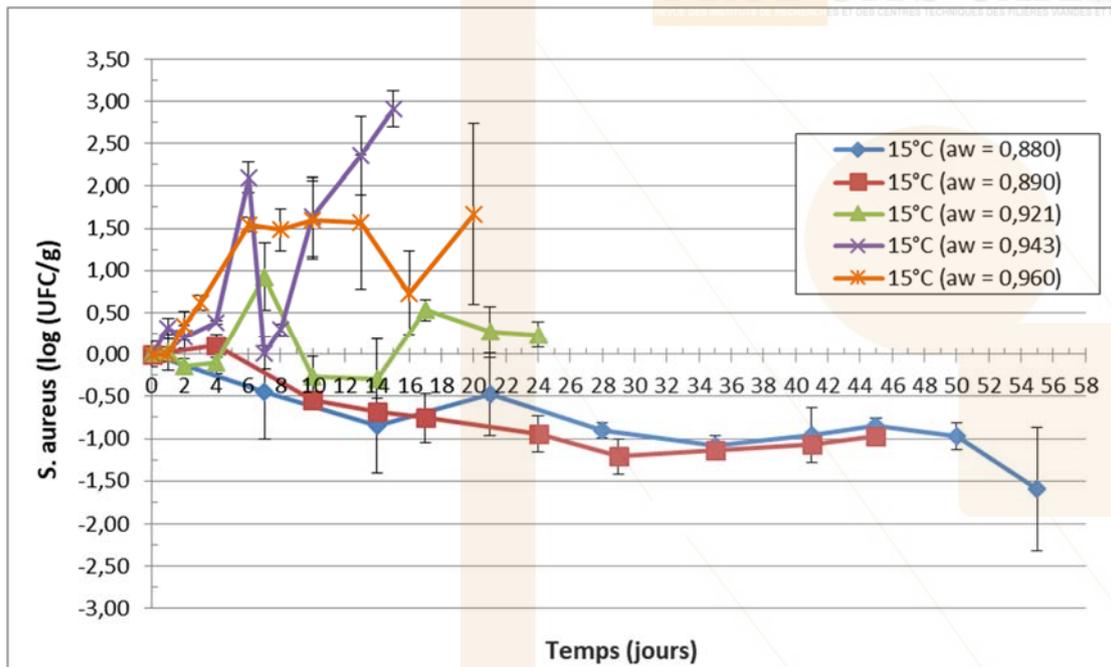


Figure 2 : Evolution relative (en delta log UFC/g) des populations de *S. aureus* en fonction de l' a_w des jambons secs et de la température de conservation (8°C, 15°C et 20°C)

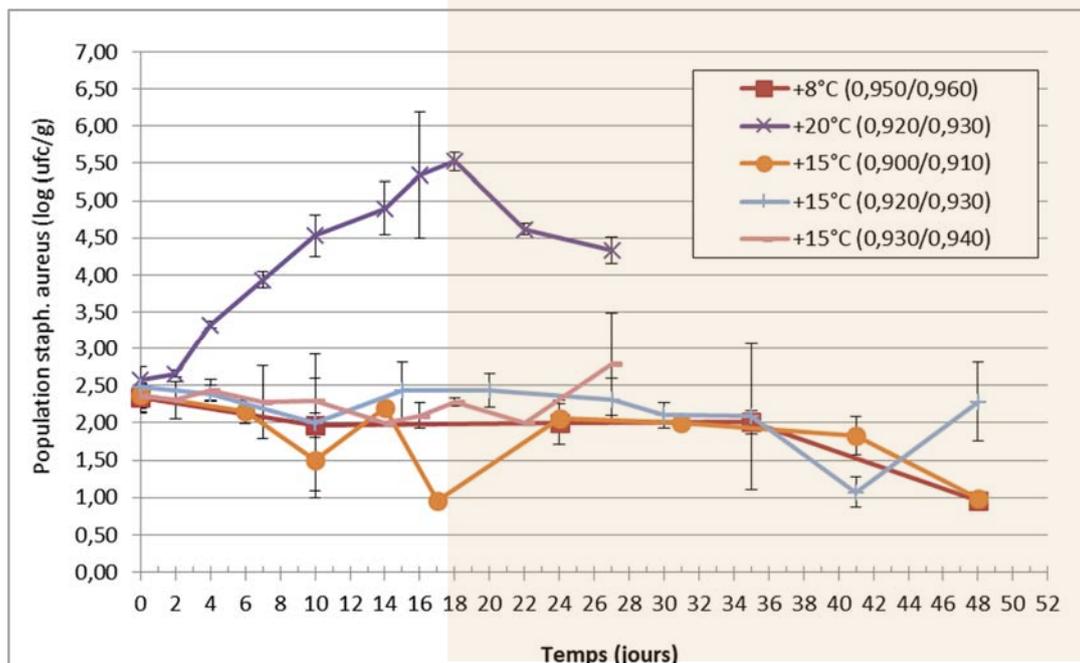
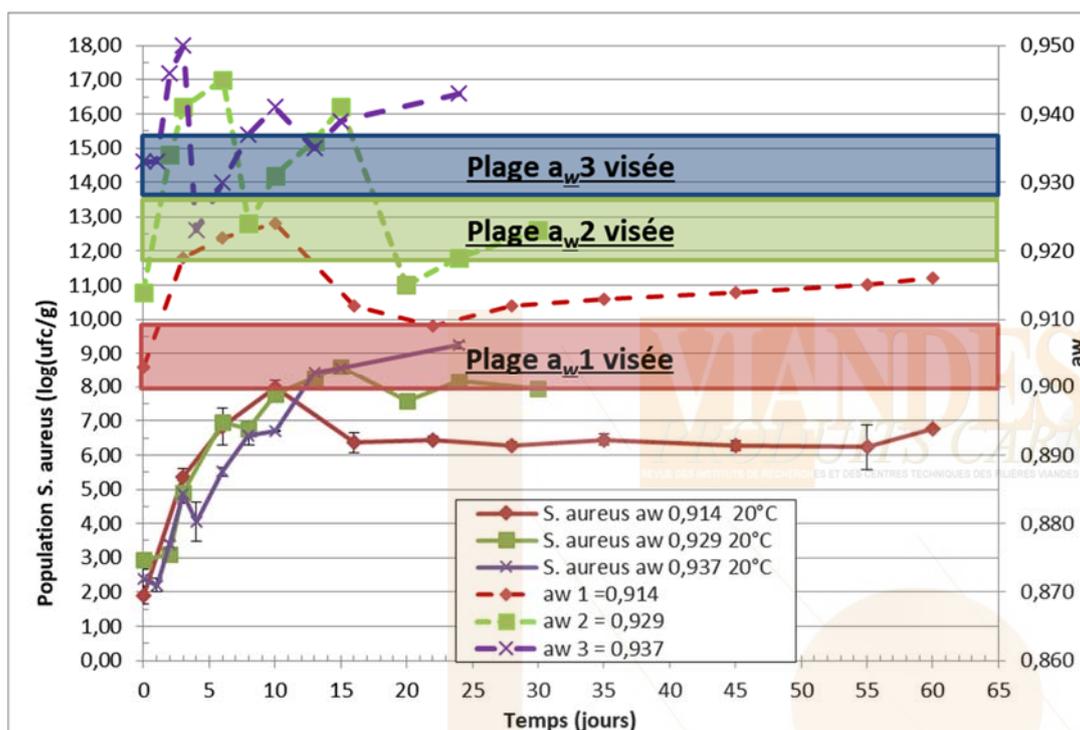


Figure 3 : Evolution des populations de *S. aureus* en fonction de l' a_w des jambons secs conservés à une température ambiante de +20°C (traits pleins : dénombrements de *S. aureus* en log UFC/g ; en traits pointillés : les valeurs d' a_w mesurées à chaque échéance)



II.3. Dosage des entérotoxines staphylococciques

Les résultats des dosages et de détection des toxines staphylococciques dans les échantillons de tranches de jambons secs contaminés sont donnés dans le Tableau 3. Les limites de détection sont de 0,018 ng/ml pour les entérotoxines de type A et 0,015 ng/mL pour les entérotoxines de type C. Les limites de quantification sont de 0,056 ng/ml pour les entérotoxines de type A et C. Même si les populations de *S. aureus* ont pu se développer fortement dans ces échantillons, la quantité de toxine produite est très faible pour les échantillons 1, 2, 3 et 5. Seul l'échantillon 4, qui présente d'ailleurs la population de staphylocoques la plus importante (6,39 log UFC/g), présente une quantité de toxines proche du

seuil de quantification. Ces résultats corroborent les recommandations formulées dans le guide de gestion des alertes de la DGAL (version juillet 2009). Il préconise en effet une recherche des entérotoxines staphylococciques, si le résultat des dénombrements de *S. aureus* est supérieur à 10^5 UFC/g. Concernant la quantité d'entérotoxines C à partir de laquelle le produit peut être considéré comme dangereux pour la santé, peu de données sont disponibles. En revanche, pour la toxine staphylococcique A, quelques données de la littérature, à partir d'épisodes toxiques (notamment une TIAC ayant eu lieu au Japon en 2000), font référence de doses estimées à 20-40 ng pour les populations sensibles.

Tableau 3 : Résultats des dosages d'entérotoxines sur les échantillons présentant des populations significatives en *S.aureus* (analyses ANSES selon méthode CAT BAC 16) - (SEA : entérotoxine staphylococcique de type A, SEC : entérotoxine staphylococcique de type C (LD : limite de détection / LQ : limite de quantification)

Température de conservation	a_w cible et stade d'analyse	Concentration moyenne en <i>S. aureus</i> en fin de conservation	Présence d'entérotoxines dans 25 g	Résultat Vidus SET2B
15°C	Echantillon 1 a_w 0943 – j4	3,86 +/- 0,02	SEC détectée mais non quantifiée (SEA < LD)	négatif
	Echantillon 2 a_w 0943 – j6	5,58 +/- 0,18	SEA et SEC détectées mais non quantifiées (< LQ)	négatif
	Echantillon 3 a_w 0943 – j13	5,84 +/- 0,46	SEA et SEC détectées mais non quantifiées (< LQ)	négatif
	Echantillon 4 a_w 0943 – j15	6,39 +/- 0,21	SEA et SEC détectées mais non quantifiées (< LQ). Résultats proches de la LQ	positif
20°C	Echantillon 5 a_w 0922 – j18	5,52 +/- 0,13	SEA et SEC non détectées (< LD)	négatif

Les échantillons 1 à 4 sont issus d'une même série expérimentale ($a_w = 0,943$ / température 15°C), avec un suivi au cours de la conservation (augmentation progressive de la concentration en *S. aureus*). L'échantillon 5 correspond à la valeur d' a_w de référence (0,922) à une température de conservation de 20°C et avec une concentration supérieure au 5 log ufc/g.

II.4. Simulation de la croissance de *S. aureus* par microbiologie prévisionnelle

L'objectif des simulations était double. Le premier but était de définir l'interface croissance / non croissance de *S. aureus* dans la matrice jambon sec en fonction de la température et de l' a_w . En cas de présence de *S. aureus* en fin de fabrication à un niveau de contamination de 100 UFC/g correspondant au seuil de dénombrement de la méthode d'analyse (norme NF EN ISO 6888-2), le second but était de déterminer la durée de conservation au-delà de laquelle les populations atteintes seraient supérieures à 10^5 UFC/g. Ce seuil de 10^5 UFC/g correspond au seuil d'alerte établi par la DGAL pour *S. aureus* (DGAL, Guide de gestion des alertes, 2009).

Les simulations ont eu pour objectif :

- d'estimer le délai pour atteindre une population de 10^5 UFC/g soit 5 log UFC/g de *S. aureus* à 8°C, 15°C et 20°C pour différentes a_w avec comme hypothèse une contamination initiale de 100 UFC/g soit 2 log UFC/g,
- de définir les zones de croissance / non croissance de *S. aureus* en combinant a_w du produit et température de conservation. On considère qu'il y a croissance, quand un potentiel de croissance supérieur ou égal à 0,5 log UFC/g peut être atteint.

Les courbes de croissance obtenues par challenge-tests ont été ajustées avec le logiciel de microbiologie prévisionnelle Sym'Previs. Ces ajustements ont permis de déterminer le taux de croissance (μ_{max}) et le temps de latence (lag). En utilisant les valeurs cardinales d'un pool de souches de *S. aureus* (disponibles dans la base de donnée Sym'Previs), le logiciel calcule ainsi les paramètres de croissance (taux de croissance et temps de latence : μ_{opt} et lag_{opt}) dans le jambon sec en conditions optimales de température, pH et a_w (Tableau

4). Les μ_{opt} varient de 0,27 à 0,67 h⁻¹ selon la cinétique utilisée. Ces taux de croissance optimaux sont plus faibles que ceux issus de la littérature en milieu de culture (μ_{opt} de 1,4 h⁻¹) ou en matrice viande fraîche (μ_{opt} de 1,72 h⁻¹) (ICMSF, Microorganisms in foods, Blackie Academic & Professional, 1996). La nature de la matrice jambon sec, ainsi que la présence d'une communauté microbienne indigène abondante, ont un impact important sur le développement de *S. aureus*.

Les résultats des simulations sont fournis dans les Tableaux 5 et 6. Ils montrent qu'en condition de température maîtrisée (+8°C), aucune croissance de *S. aureus* n'est observée dans un délai de 120 jours, dans des zones musculaires du jambon sec à a_w inférieure à 0,950 (zones vertes). A la température de +20°C, seules des valeurs d' a_w inférieures ou égales à 0,890 sont de nature à bloquer la croissance de *S. aureus*. Or, peu de produits répondent à ces caractéristiques en tous points du jambon, notamment dans les zones humides et peu salées telles que le jarret. Compte tenu de ces résultats, *S. aureus* doit donc être considéré comme un réel danger microbiologique pour les jambons secs tranchés dont l' a_w ne serait pas en tout point inférieure ou égale à 0,89 commercialisés à température ambiante (zones rouge/orange).

La confrontation de ces simulations aux données expérimentales montre que ces simulations sont sécuritaires et surestiment légèrement la croissance pour l' a_w limite de 0,910. Par ailleurs, ces simulations sont également sécuritaires compte tenu que la souche MW2 choisie pour la réalisation des tests de croissance s'est avérée plus tolérante aux basses a_w .

Tableau 4 : Valeurs de taux de croissance (μ_{max} et μ_{opt} en h⁻¹) et de temps de latence (lag et lag_{opt} en h) obtenues à partir des données expérimentales de tests de croissance réalisés à 8°C, 15°C et 20°C dans du jambon sec

T°C	a_w	pH	μ_{max}	lag	μ_{opt}	lag_{opt}
8°C	0,949	5,77	Non déterminé / pas de croissance			
	0,956	5,74	Non déterminé / pas de croissance			
15°C	0,880	5,75	Non déterminé / pas de croissance			
	0,886	5,69	Non déterminé / pas de croissance			
	0,905	5,87	Non déterminé / pas de croissance			
	0,921	5,76	Non déterminé / croissance non significative			
	0,926	5,86	Non déterminé / pas de croissance			
	0,934	5,92	Pas de croissance jusque 22 j / + 0,44 log UFC/g à J27			
	0,943	5,84	0,034 ⁽¹⁾ 0,017 ⁽²⁾	168 ⁽¹⁾ 0 ⁽²⁾	0,6695 ⁽¹⁾ 0,3302 ⁽²⁾	8,8 ⁽¹⁾ 3,4 ⁽²⁾
	0,960	5,65	0,037	0	0,6659	0,79
20°C	0,922	5,76	0,0228	3,11	0,2685	0,27
	0,925	5,75	+ 2 log UFC/g à J12 puis décroissance			

⁽¹⁾ valeurs obtenues après avoir ôté un point correspondant à une a_w mesurée élevée –proche de 0,96- ; ⁽²⁾ valeurs obtenues en tenant compte de tous les points expérimentaux.

Tableau 5 : Simulation de la croissance de *S. aureus* dans le jambon sec tranché en fonction de la température et de l' a_w (pH 5,9)

a_w	Délai nécessaire pour atteindre 5 log UFC/g à		
	8°C	15°C	20°C
0,88	>120j	>120j	>120j
0,89	>120j	>120j	>120j
0,90	>120j	>120j	>120j
0,91	>120j	>120j	35j
0,92	>120j	67j	15j
0,93	>120j	29j	12j
0,94	>120j	21j	9j
0,95	>120j	17j	8j
0,96	>120j	15j	7j
0,97	>120j	13j	7j

(délai pour atteindre 5 log UFC/g - hypothèse d'une contamination initiale de 2 log UFC/g : en vert, plus de 120 jours, en orange, de 10 à 120 jours, en rouge, moins de 10 jours).

DISCUSSION - CONCLUSION

Dans des conditions de conservation réglementaires actuellement pratiquées par les professionnels (+8°C), les résultats de cette étude montrent qu'aucune croissance de *S. aureus* n'est observée dans un délai de 120 jours de conservation, dans des zones musculaires du jambon sec dont l' a_w est inférieure à 0,950.

En revanche, à température ambiante représentée ici par des tests réalisés à +20°, seules des valeurs d' a_w inférieures ou égales à 0,890 sont efficaces pour bloquer la croissance de *S. aureus* durant 120 jours. En dehors de cette condition ($a_w \leq 0,89$), la température et l' a_w ont un impact significatif sur la croissance de *S. aureus* : des valeurs d' a_w supérieures à 0,910 / 0,920, combinées à une température de +20°C, semblent favorables à une croissance rapide de cette bactérie pathogène. Les dosages de toxines staphylococciques effectués sur quelques échantillons de jambons secs confirment la pertinence du seuil de 10⁵ UFC/g de *S. aureus* comme critique pour déclencher la recherche de ces toxines. Ils démontrent aussi que le risque de présence de ces toxines sur des jambons secs tranchés, conservés à température ambiante existe. Il faut par ailleurs noter, que pour un inoculum initial moyen de 100 UFC/g de *S. aureus*, seuls 20 échantillons de jambons secs sur les 300 analysés lors des tests de croissance, ont atteint des populations supérieures à 10⁵ UFC/g avec une population maximale de 3,3 10⁶ UFC/g.

Des études scientifiques sur l'impact des valeurs de a_w et de la température sur la bactérie *S. aureus* sont disponibles mais une grande majorité a été conduite dans des conditions de laboratoire mimant les conditions du jambon sec et non sur

Tableau 6 : Interface croissance/non croissance de *S. aureus* dans le jambon sec en fonction de la température et de l' a_w (pH 5,9)

a_w	Potentiel de croissance >0,5log à J120		
	8°C	15°C	20°C
0,88	(-)	(-)	(-)
0,89	(-)	(-)	(-)
0,90	(-)	(-)	(10)
0,91	(-)	(27)	(4)
0,92	(-)	(9)	(3)
0,93	(-)	(5)	(2)
0,94	(-)	(4)	(2)
0,95	(-)	(3)	(2)
0,96	(65)	(3)	(2)
0,97	(43)	(3)	(1)

Vert = pas de croissance ; orange = croissance (nombre de jours nécessaires pour atteindre 0,5 log de potentiel de croissance compris entre 10 et 120 jours) ; rouge = croissance (nombre de jours nécessaires pour atteindre 0,5 log de potentiel de croissance inférieur à 10 jours)

produits réels fabriqués dans des conditions industrielles (Portocarrero *et al.*, 2002, Rajkovic, 2012, Reynolds *et al.*, 2001, Untermann et Müller, 1992). En 2001, Reynolds *et al.* ont été les premiers à avoir évalué le rôle du procédé du jambon sec sur la maîtrise de plusieurs bactéries pathogènes, incluant *S. aureus*. Ces auteurs ont montré que les interactions entre la concentration en sel (8%), le pH (5.5), l' a_w (0.92) et la température de conservation de 20°C permettent un léger développement de *S. aureus* de l'ordre de + 0.5 log UFC/cm², sans production d'entérotoxines. Cependant, cette étude (Reynolds *et al.* 2001) a été menée sur des jambons avec une concentration en sel très élevée. *In vitro*, Valero *et al.* (2009) ont montré que la croissance de *S. aureus* pouvait survenir à un pH de 4,5 pour des valeurs d' a_w allant de 0,915 à 0,960 à des températures supérieures à 13°C. Rajkovic (2012) a également montré que la production d'entérotoxines staphylococciques est possible sur des jambons secs conditionnés sous vide ou sous atmosphère protectrice, conservés à 20°C et à 37°C ; Cependant, ces auteurs n'ont pas observé de production à une température de 12°C.

Enfin, cette étude souligne l'hétérogénéité de l' a_w dans différents points d'une même tranche. Les zones sensibles telles que le jarret dont les valeurs d' a_w peuvent atteindre 0,950, (car humide, peu salé et soumis aux contaminations compte tenu des opérations de désossage) doivent être privilégiées lors de l'échantillonnage par rapport à des mesures moyennes sur des tranches complètes.

Références :

- AFNOR (2014). Norme NFV 01-009 - Lignes directrices pour la réalisation de tests de croissance microbiologique.
- ANSES (2011). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques.
- Arrêté du 21 décembre 2009 relatif aux règles sanitaires applicables aux activités de commerce de détail, d'entreposage et de transport de produits d'origine animale et denrées alimentaires en contenant (JORF, 31/12/2009).
- DGAL (2009). Guide d'aide à la gestion des alertes d'origine alimentaire entre les exploitants de la chaîne alimentaire et l'administration lorsqu'un produit ou un lot de produits est identifié. Version révisée du 02/07/2009.
- FCD (2016). Critères microbiologiques applicables aux activités de fabrication, préparation, découpe ou simple manipulation des denrées nues, en rayon « à la coupe » et en atelier magasin.
- Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène industries charcutières, FICT
- ICMSF (1996). Microorganisms in foods, Blackie Academic & Professional.
- Note de service DGAL/SDSSA/N2012-8054 du 08 mars 2012.
- Picgirard L., Monziols M. (2012). Impact du mode de salage de jambons secs sur l'évolution du taux de sel et de l'aw des masses musculaires au fil du procédé. 14^{èmes} Journées des Sciences du Muscle et Technologie des Viandes, 13 - 14 Novembre 2012, Caen, France [Poster]
- Potocarrero S., Newman M. (2002). *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different procedures. *Meat science*, 62(2), p. 267-273.
- Règlement européen (CE) n°2073/2005, modifié par le règlement (CE) n°1441/2007, concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.
- Rajkovic. A. (2012). Incidence of growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in insufficiently dried traditional beef ham « govđja prsuta » under different storage conditions. *Food control*, 27(2), p. 369-373.
- Reynolds, A.E, Harrison, M.A , Rose-Morrow, R., Lyon, C.E, (2001). Validation of Dry Cured Ham Process for Control of Pathogens. *Journal of Food Science*, 66, 1373–1379.
- Untermann F., Müller C. (1992). Influence of aw value and storage temperature on the multiplication and enterotoxin formation of staphylococci in dry cured ham. *International Journal of Microbiology*, 16(2), 109-115.
- Valero A., Pérez-Rodríguez F., Carrasco E., Fuentes-Alventosa J.M., García-Gimeno R.M., Zurera G. (2009). Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Microbiology* 133, 186–194.
- FCD (2016). Critères microbiologiques applicables aux activités de fabrication, préparation, découpe ou simple manipulation des denrées nues, en rayon « à la coupe » et en atelier magasin.