

K = txt.àLir

Imprimer commentaire dia

Examen Bactériologique des Aliments

Auto-Contrôle par les Professionnels

TD ENVT HIDAOA - Hubert Brugère, Denis Corpet
MàJ partielle janv 2013




Cadre réglementaire

- Abrogation de l'arrêté du 21 décembre 1979 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées d'origine animale.

- Règlement CE 2073/2005 de la Commission Européenne Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.
Un des règlement du **Paquet Hygiène**,
Applicable depuis le 1er janvier **2006**.

- On est passé d'un cadre strict, contraignant mais sécurisant, avec des critères microbiologique imposés
- A une "responsabilisation" moins confortable ! Conséquence fréquente = augmentation du nombre d'analyses microbiologiques !



Un peu de recherche prospective: Comment décider
"combien de bactéries sont acceptables, combien sont "trop" ?"

FSO/ALOP based food safety policy

FSO = Food Safety Objective

ALOP = Appropriate Level of Protection

Objectif de Sécurité de l'Aliment (FSO) =
Fréquence (ou concentration) d'un danger,
dans l'aliment consommé, qui donne
le niveau approprié de protection (ALOP).

Exemple hypothétique de FSO:

le niveau de *Listeria monocytogenes* dans un aliment prêt à l'emploi
ne doit pas dépasser 3 Log CFU/portion (=1000 bactéries)

Comment établit-on les FSO à partir des ALOP ?

De ALOP à FSO

La théorie

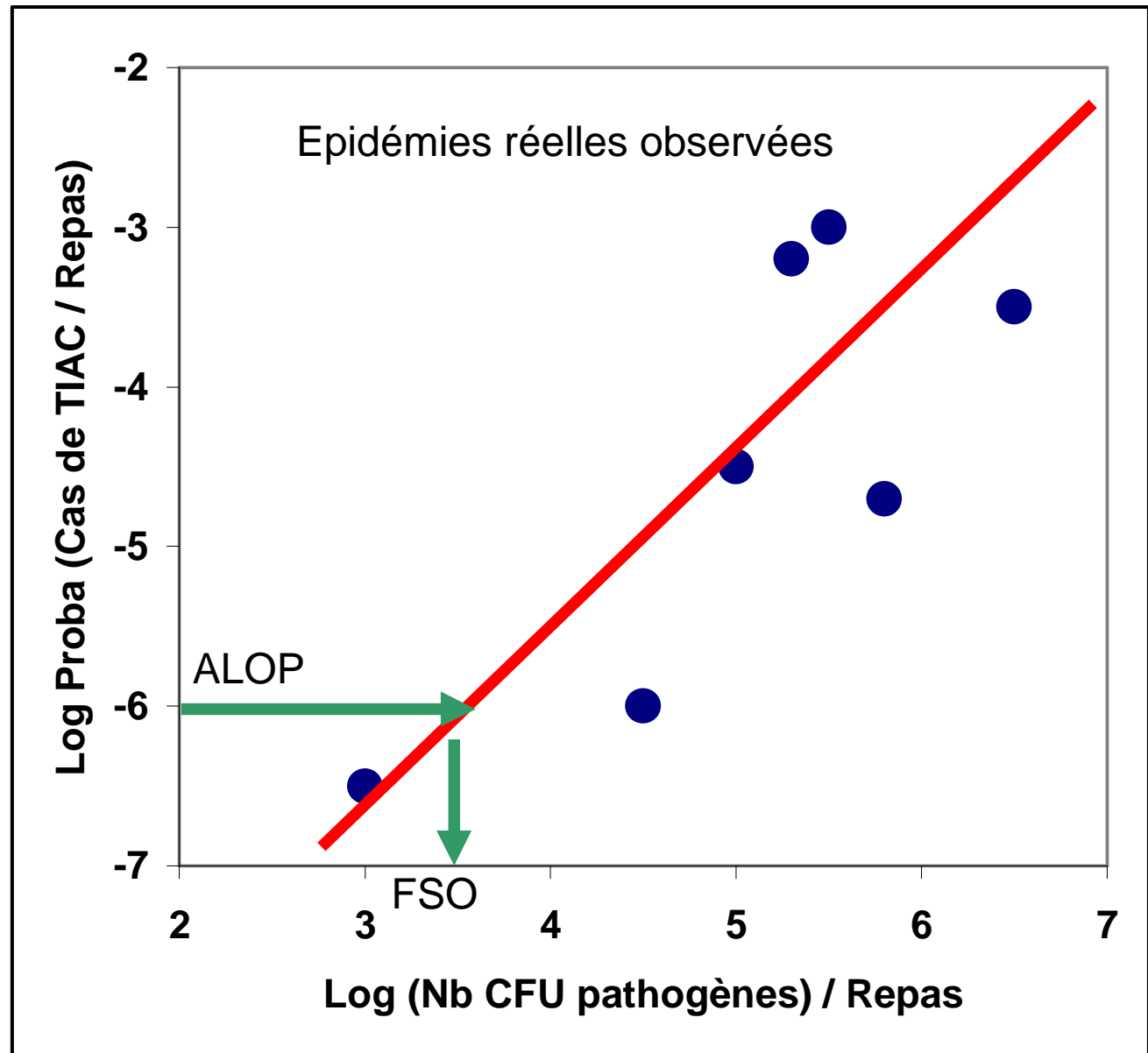
1- On construit la courbe observée entre les cas épidémiques et la contamination des repas (*bcp d'incertitudes !!*)

2- Choisir ALOP: par ex. on décide qu'on veut Un "cas" malade pour Un million de repas


Donc **ALOP = 10^{-6}**

3- On en déduit qu'on Veut moins de 3.5 log Du pathogène par repas
FSO = 3.5 log CFU

4- Marge de sécurité: On met le critère de sécurité plus bas que le FSO, par ex **< 100 CFU** du pathogène



FSO, Food safety objective
ALOP, Appropriate level of protection

- 
- 1 « Pour contribuer à la **protection de la santé publique** et éviter les interprétations différentes, il convient de **définir des critères de sécurité harmonisés** relatifs à l'acceptabilité des denrées alimentaires. »

→ critères de **sécurité des denrées alimentaires**



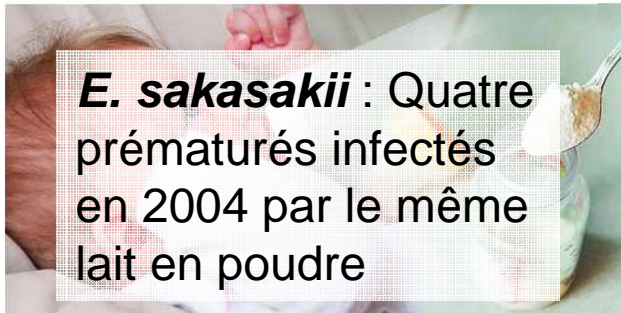
- 2 « Les critères microbiologiques fournissent également une **orientation sur l'acceptabilité des denrées alimentaires et de leurs procédés de fabrication, de manutention et de distribution**. L'utilisation de ces critères devrait faire partie intégrante de la mise en oeuvre des procédures fondées sur les **principes HACCP** et les autres mesures de contrôle de l'hygiène. »

→ critères **d'hygiène des procédés**

1 → critères de sécurité des denrées alimentaires

Sécurité = Pas de microbe pathogène
ont été retenus:

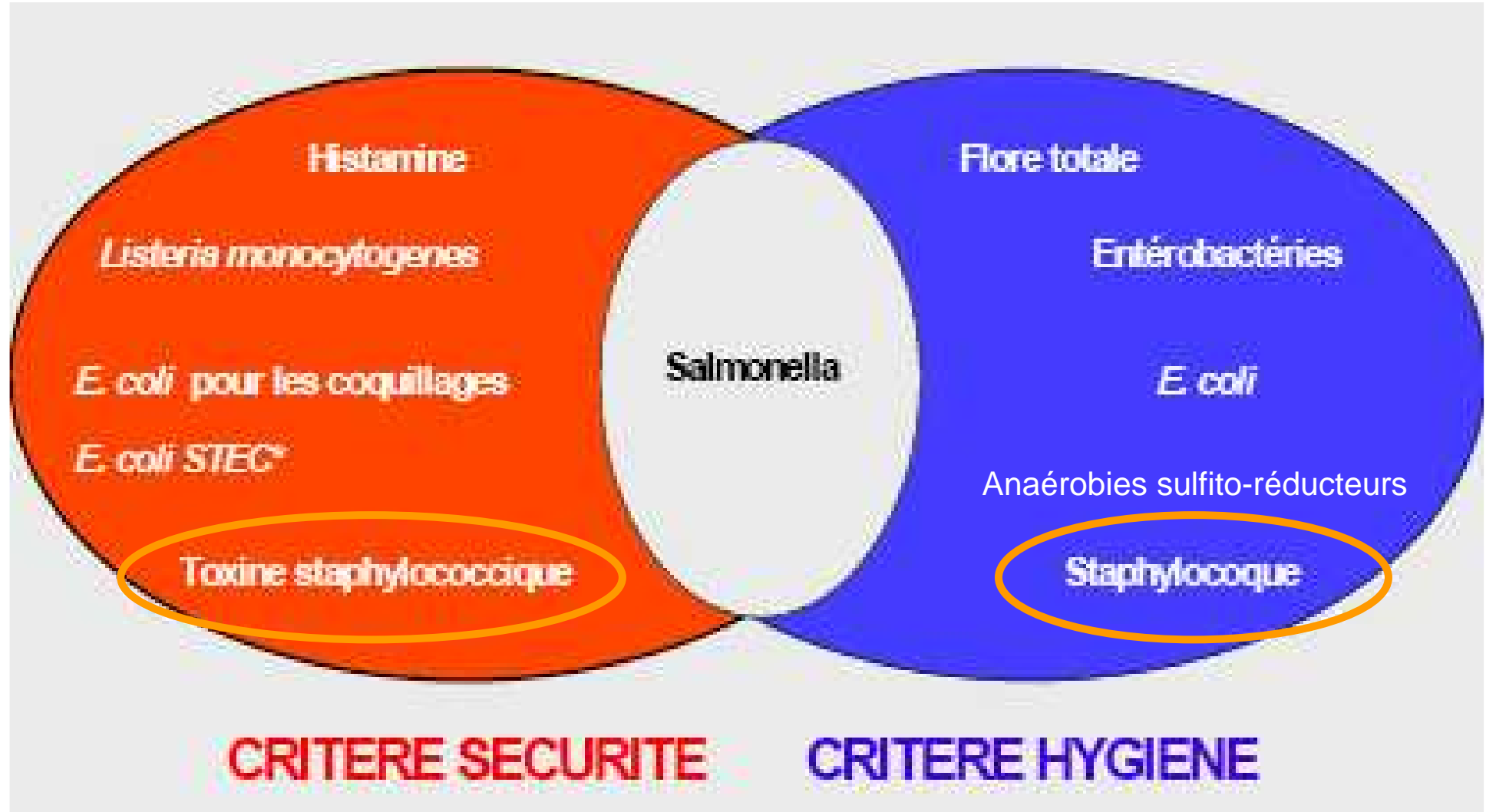
- *Listeria monocytogenes*
- Salmonelles
- Entérotoxine de Staph. aureus
- Histamine (poissons)
- *Enterobacter sakasakii* (actualité, lait poudre)
- On ne cherche ni *E.coli*, ni virus (Norovirus, hépatite A), car on n'a pas de méthode fiable



2 → critères d'hygiène des procédés

Hygiène procédés = il ne faut pas "trop" de bactéries banales pas "trop" de contaminants "témoins" (d'origine fécale)

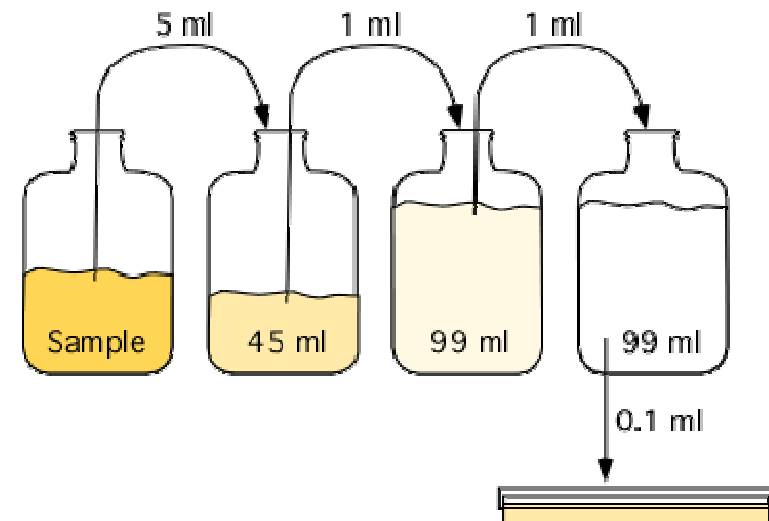
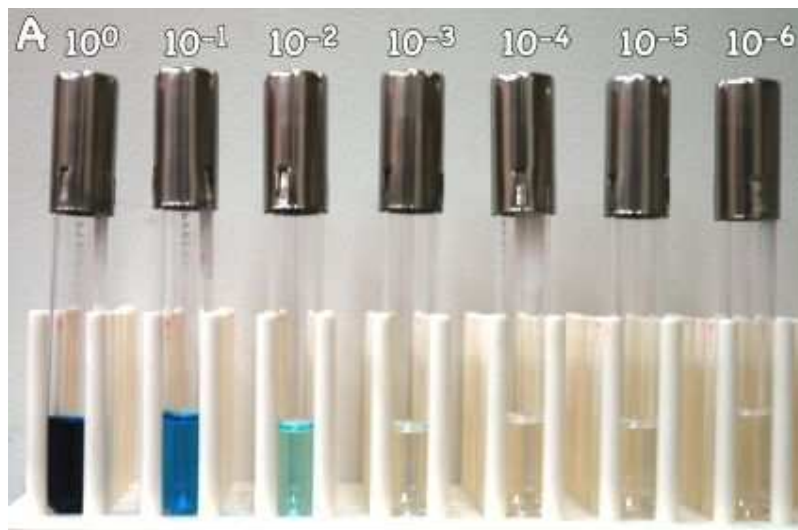
Critère sécurité // Critère hygiène



Dénombrement: réalisation



- Prélèvement stérile, transport au froid
- Préparation des 5 échantillons:
 - Aliment solide, broyé dans un liquide stérile
 - Réalisation de dilutions décimales (1 dans 9)



Dénombrement en milieu liquide

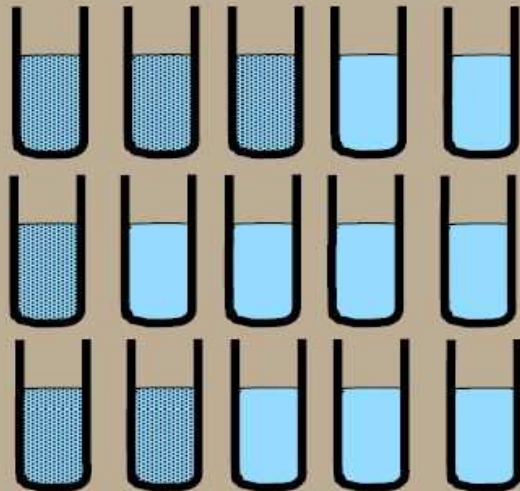
- Pour chaque série de culture issue de la même dilution on compte le nombre de tubes positifs (3 séries identiques)
- On compose le nombre caractéristique, et la lecture de la table de **Mac Grady** nous donne le Nombre le Plus Probable: **NPP**.

- Avantages:
 - Mise en évidence d'un caractère particulier
 - Phase de réanimation, enrichissement tout fait pour suite
- Inconvénients:
 - Manque de précision (variabilité de ± 1 log)
 - Lourde à mettre en oeuvre

2.2. CULTURE LIQUIDE

Estimation statistique

Nombre le plus probable (NPP)



1 ml dans 9 ml

10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
+	+	+	-	-
+	-	-	-	-
+	+	-	-	-
3	2	1	0	0

Table de Mac Grady

NPP

3	2	0	9
3	2	1	15
3	2	2	21




Table de Mac Grady pour 3 tubes par dilution

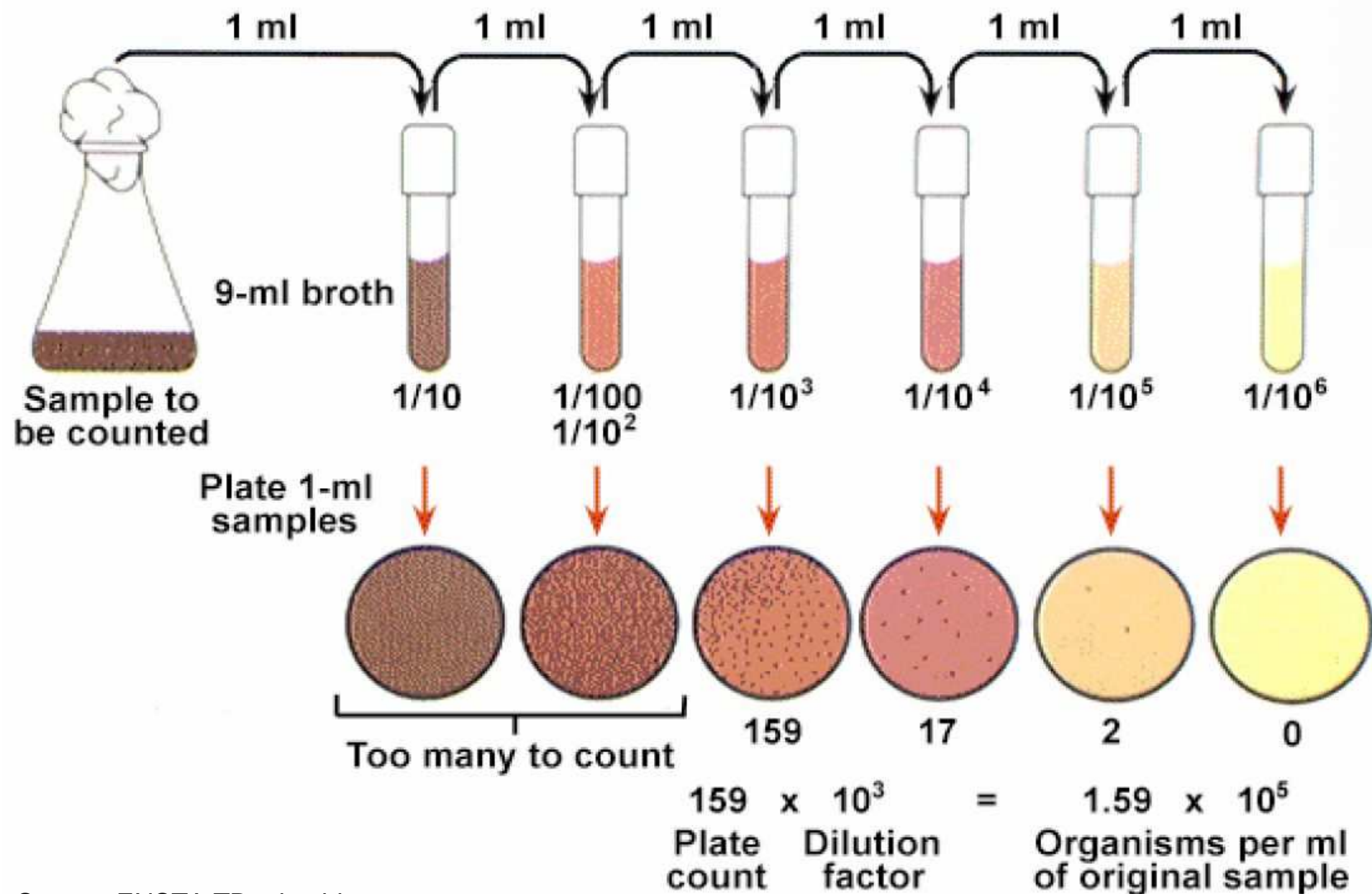
Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP	Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP
0	0	0	< 0,3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	2	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2,3
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	2	3	29
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	> 110



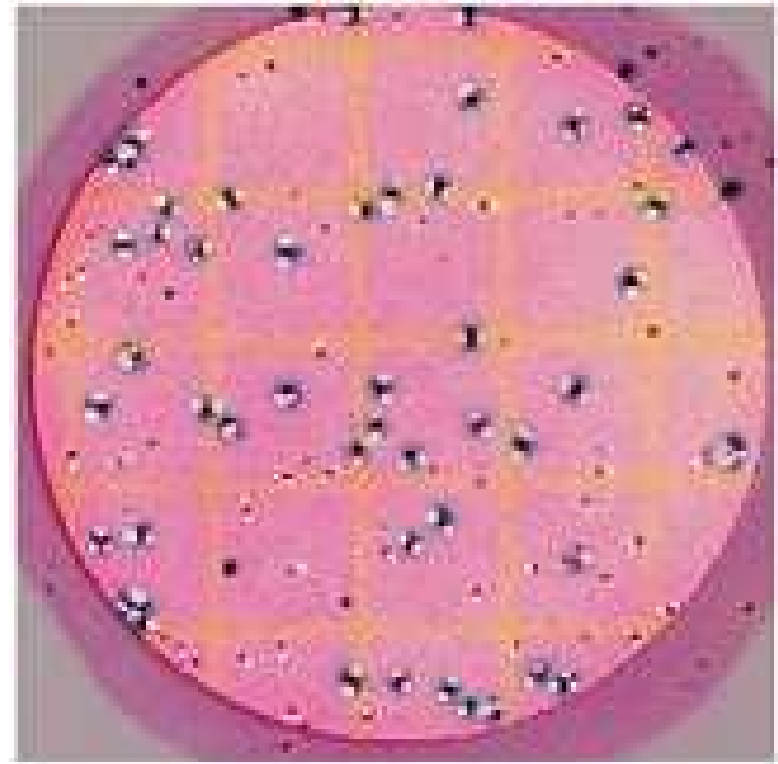
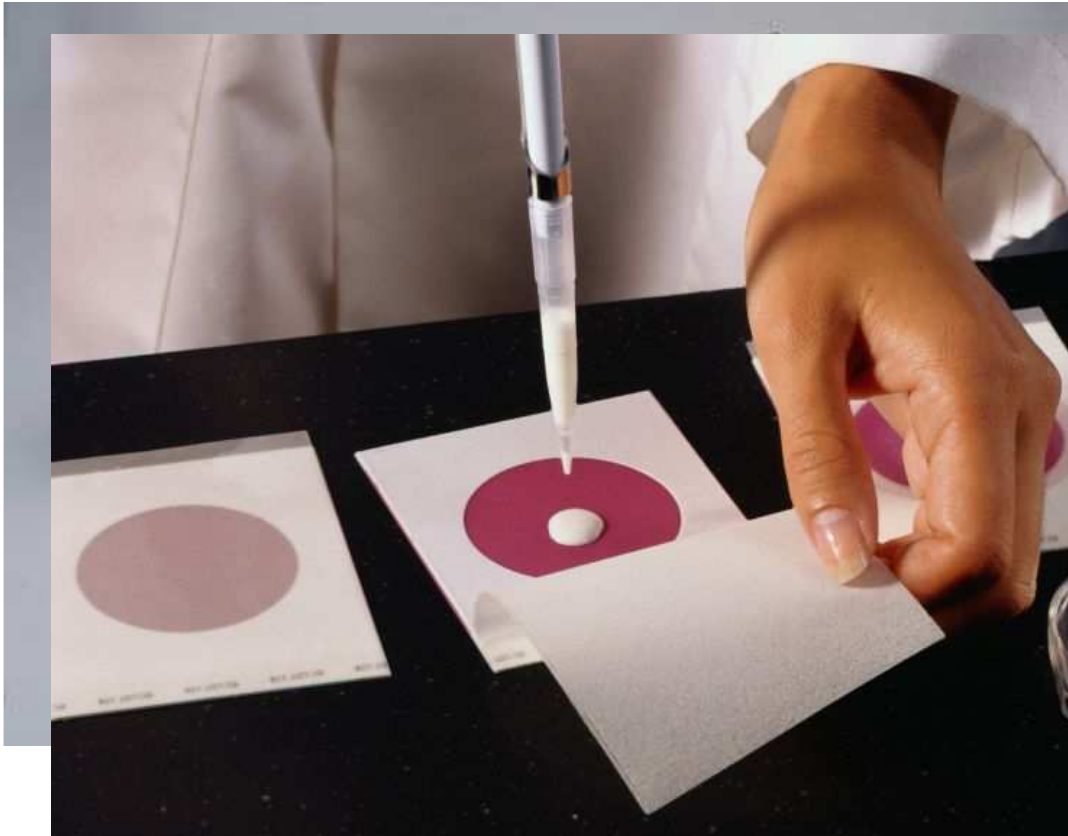
Dénombrement sur milieu solide

- Une bactérie, placée sur un milieu favorable, donnera naissance à une colonie macroscopiquement visible.
UFC = Unité formant colonie
- Etalement en surface ou en profondeur

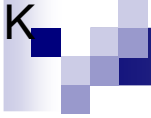




Petrifilm

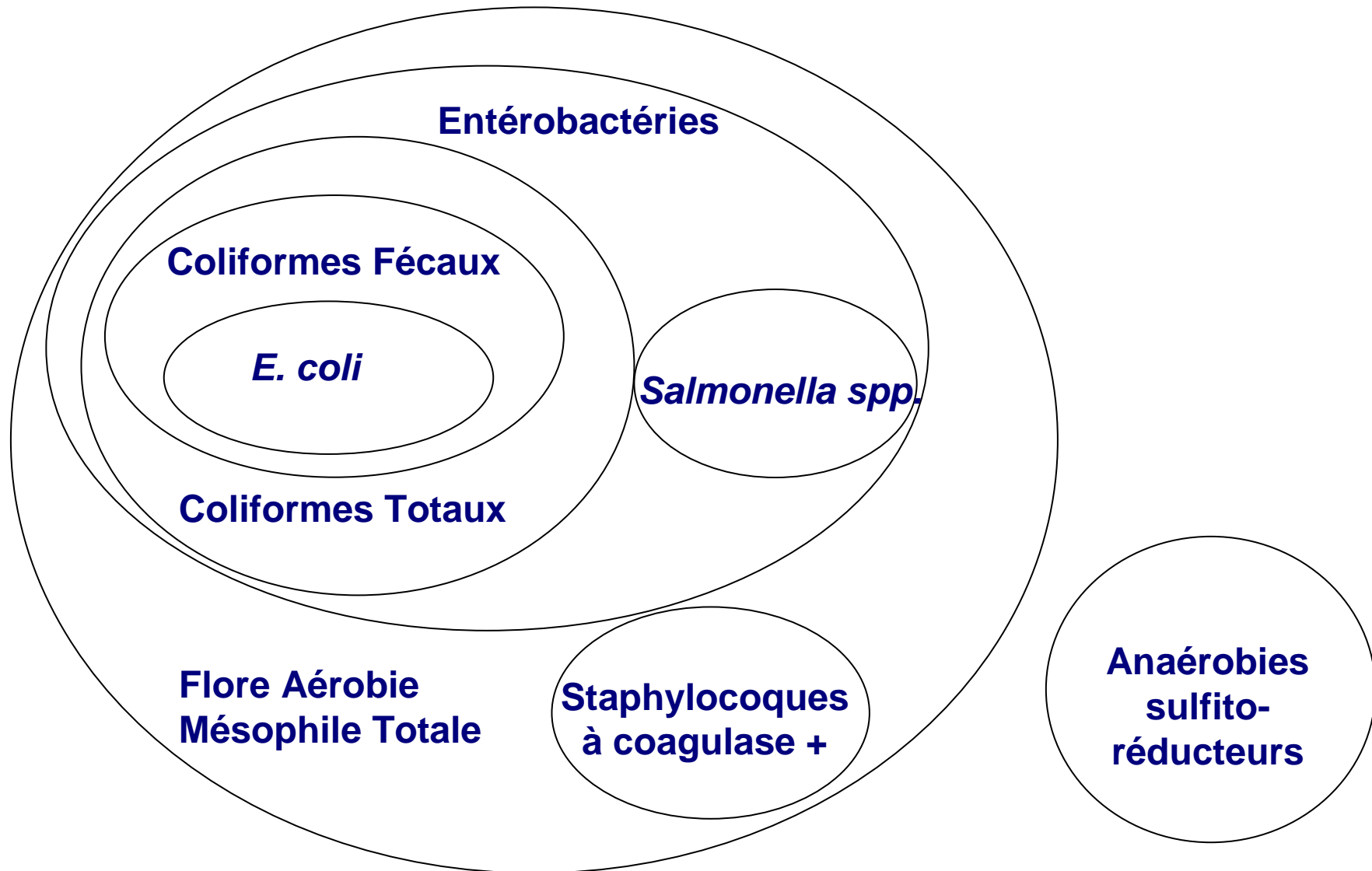


Pétrifilms ou boîtes de Pétri: quelles dilutions compter ?
Comment calculer les UFC = nombre de bactéries par g ou par ml ?
Comment exprimer le résultat ?



Micro-organismes dénombrés ou recherchés

dans les analyses de routine => on va les voir plus en détail ...



Milieux de culture

Qu'y a-t-il dans un milieu de culture ?

N.S.



Couvrir les Besoins en Nutriment

Manger quoi et combien pour avoir assez ?

- **Eau**: régulation = la soif. Bon ex. difficulté bilan !
- **Energie**: régulation = la faim / stabilité poids/BMI
augmenter densité nutr, augmenter dépenses énergie
- **Protéines**: azote total / AAE / VB / complémentation
Quelle régulation ? Appétit spécifique ?
- **Lipides**: AGE = AGPI n-3 n-6
- **Glucides**: 150g « glucose » (cerveau) / 30g fibres
- **Minéraux**: Ca (P) (Na) K Mg Fe ...
- **Vitamines**: hydrosolubles (B, C, K, PP), liposolubles (A, D, E)



Flore aérobique mésophile totale = FAMT = Microorganismes Totaux

- Ensemble des germes capables de se développer sur un milieu nutritif à 30°C en aérobiose.
- Milieu ordinaire : gélose pour dénombrement ou PCA, contenant peptone, glucose, extrait de levure.
- Indicateur d'hygiène générale, évaluation de l'altération microbienne des denrées
- Attention flore technologique
- Recherche de flores plus sélectives pour certains produits

Milieux de culture sélectifs

Entérobactéries	Gélose au cristal violet, rouge neutre, bile, glucose (VRBG) ou lactose (VRBL)
Coliformes	Gélose désoxycholate lactose Bouillon lactosé bilié au vert brillant
<i>E. coli</i>	BLBVB ou le bouillon de Mac Conkey

Milieux de culture **sélectifs**:

- inhibent la croissance de certains micro-organismes
- révèlent la croissance de ceux qui sont recherchés

Hetkoen

VRBL

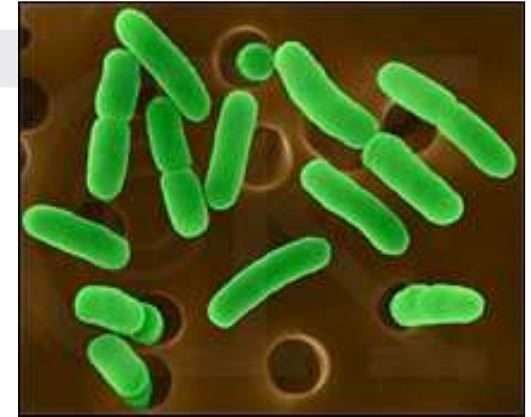




Entérobactéries

- Bacilles droits, Gram-, aéro-anaérobie
Réduction des nitrates en nitrites
Fermentation du glucose
Oxydase négatif
- Nombreuses espèces = hôtes normaux du tube digestif des animaux
Bactéries fécales fréquemment des contaminants alimentaires d'origine fécale
Certaines espèces sont pathogènes: **lesquelles ?**

Coliformes



- **Coliformes** (déf. ISO) (qui a la forme de *E.coli*) : Bacilles Gram-, non sporulés, aéro-anaérobies, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et en **fermentant le lactose** avec production d'acide et de gaz à 37°C.
- **Coliformes thermotolérants ou fécaux**: déf. Idem à 44°C
- ***E.coli* présumés** : Coliformes thermotolérants + production d'indole à partir du typtophane.
- ***E.coli*** : *E.coli* présumés + RM (rouge de méthyle) positifs, VP (Voges-Proskauer) négatif, Citrate négatif

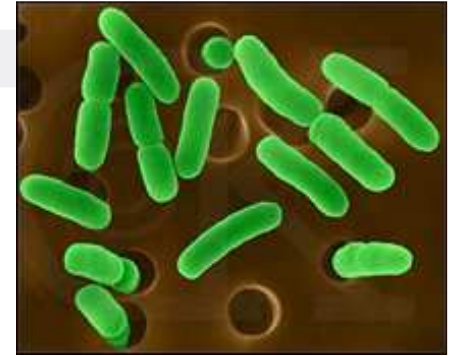
Indicateurs de contamination d'origine fécale

Un indicateur doit:

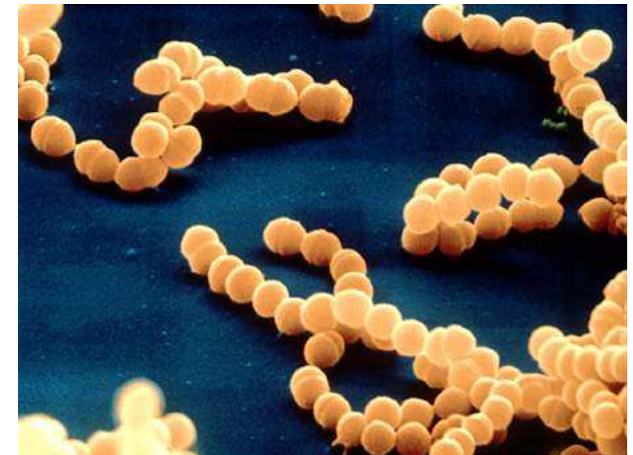
- toujours être présent lorsque les micro-organismes pathogènes sont présents
- apparaître en plus grand nombre que les agents pathogènes associés
- avoir le même comportement que les agents pathogènes dans l'environnement naturel et au cours des procédés de fabrication
- doit être mis en évidence, dénombré et identifié à l'aide de techniques simples.



Indicateurs de contamination d'origine fécale

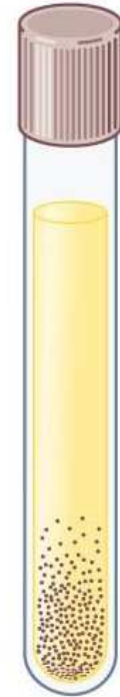


- Coliformes totaux / fécaux (44°C) / *E. coli*
- Développement de nouveaux milieux chromogènes spécifiques de *E. coli*
généralisation de cet indicateur qui est un des plus sensibles et le plus spécifique
- Entérobactéries et coliformes totaux renseignent sur la maîtrise de l'hygiène générale
- Streptocoques fécaux, plus résistants dans le milieu, indicateurs du futur ?



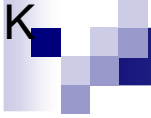
Anaérobies sulfito-réducteurs

- *Clostridium*:
 - hôtes normaux de l'intestin
 - Tellurique
 - Dans les matières en putréfaction
- Dénombrement sur
Tryptone Sulfite Cyclosérine
- Indicateur d'hygiène générale
Présomption de la présence de
Clostridium perfringens



Obligat
anaerobes



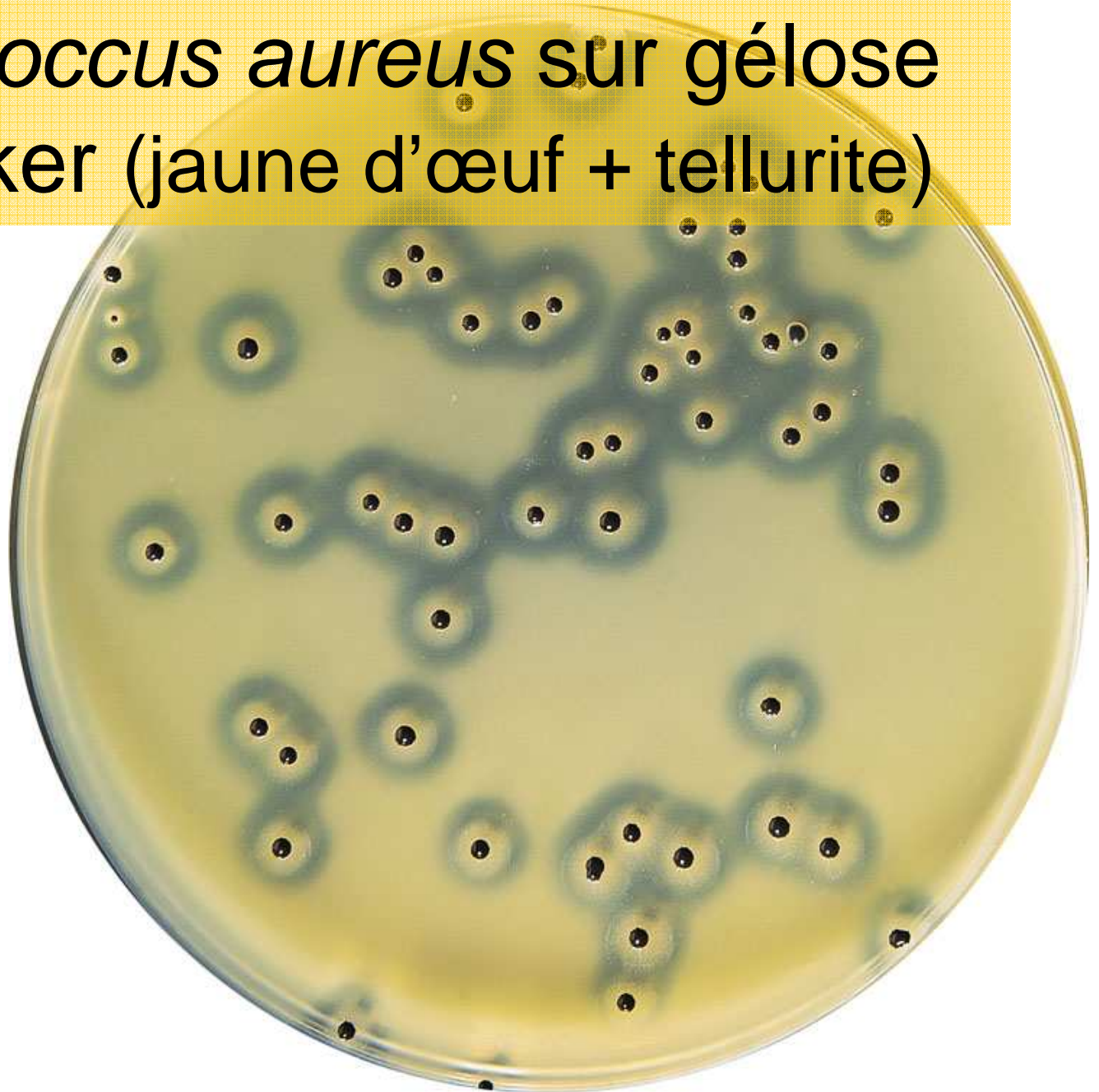


Staphylocoques à coagulase +

- *S. aureus* est à la fois:
 - Germe pathogène car peut sécréter une toxine
 - Indicateur d'hygiène
- Dénombrement sur gélose de Baird-Parker (dia suiv)
- Vérifier l'activité coagulase +
- Si nécessaire,
recherche entérotoxines staphylococciques =
critère de sécurité pour les produits laitiers

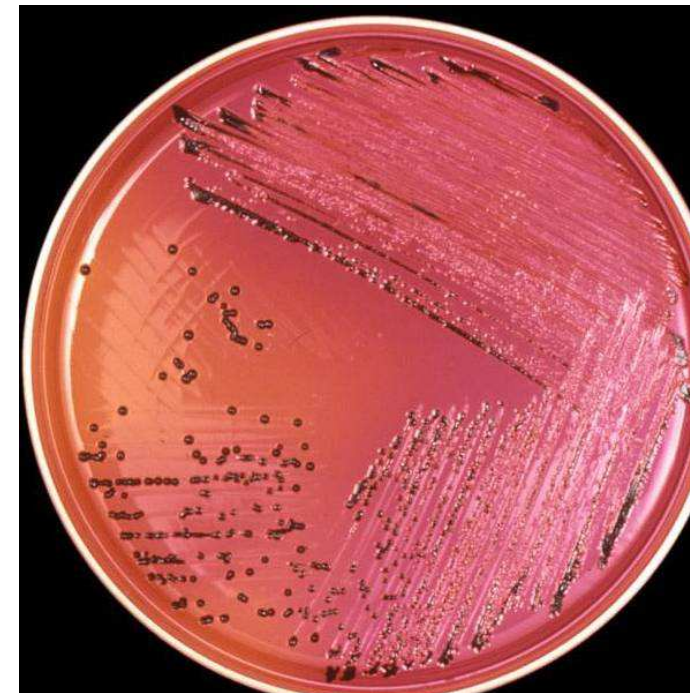
Staphylococcus aureus sur gélose
Baird-Parker (jaune d'œuf + tellurite)

colonies
de staph.
noires,
entourés
d'un halo
+ précipité



Salmonella spp.

- Dangereux par simple présence
- Principale source : origine fécale, contamination croisée
- Recherche:
 - Pré-enrichissement
 - Enrichissement sur bouillon au sélénite ou au térathionate
 - Isolement sur gélose au vert brillant et rouge de phénol et une autre gélose éventuellement.
 - J+3 : suspicion de présence de Salmonelles
 - J+4 : confirmation ou non par la galerie API





Critères de **sécurité** des denrées alimentaires

- critère **définissant l'acceptabilité d'un produit** ou d'un lot de denrées alimentaires, **applicable aux produits mis sur le marché**
- Les résultats des analyses :
 - révèlent la qualité microbiologique du lot contrôlé.
 - peuvent aussi être utilisés pour démontrer l'efficacité de l'application du système HACCP ou des bonnes pratiques d'hygiène dans le cadre du procédé.



Critère microbiologique pour un aliment

Eléments pris en compte

- Un critère microbiologique permet de **s'assurer qu'un aliment est acceptable** compte tenu du nombre de bactéries présents.

Il se compose des éléments suivants:

- Microorganismes /toxines indésirables
- Méthodes d'analyse pour les détecter / les quantifier
- Plan d'échantillonnage (Nb prélev^{ts}, taille échantillon)
- Limites microbiologiques jugées appropriées à l'aliment
- Nombre d'unités qui doivent être conformes aux limites.
- Un critère microbiologique doit également stipuler l'aliment et le stade de la chaîne auxquels il s'applique, et les mesures à prendre lorsqu'il n'est pas satisfait.



Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes / toxines, métabolites	Plans d'échantillonnage ¹		Limites ²		Méthode d'analyse de référence ³	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
1.4 Viande hachée et prépa de viande destinées à être consom. crues	Salmonella	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.5 Viande hachée et préparations de vde de volailles destinées à être consom. cuites	Salmonella	5	0	2006 Absence dans 10 g À partir de 2010 Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

Plan d'interprétation à 2 classes : satisfaisante / insatisfaisante

Si **non satisfaisant**, aliment **NON commercialisé**, et même **RAPPEL** si déjà mis en vente



Critères d'hygiène des procédés

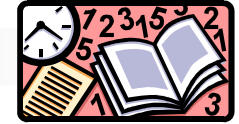
- critère **indiquant l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production**. Un tel critère n'est pas applicable aux produits mis sur le marché. Il fixe une valeur indicative de contamination **dont le dépassement exige des mesures correctives destinées à maintenir l'hygiène du procédé conformément à la législation sur les denrées alimentaires**.
 - Viandes et produits à base de viande
 - Lait et produits laitiers
 - Ovoproduits
 - Produits de la pêche
 - Légumes, fruits et produits à base de légumes et de fruits



Interpréter un Plan à trois classes pour tester l'hygiène des procédés

- Une troisième classe « acceptable » se glisse entre « satisfaisant » et « non satisfaisant »
- On* définit deux limites microbio (**m** seuil bas et **M** seuil haut): on acceptera que quelques échantillons se trouvent entre les deux
- Le plan d'échantillonnage définira donc le nombre de prises d'échantillons **n** et le nombre acceptable entre les deux limites **c**

* « On » c'est le règlement CE 2073/2005, qui dit : n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M , pour le nombre d'échantillons n réalisé



Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan échantillonnage		Limites		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
Préparations de viande	<i>E. coli</i>	5	2	500 ufc/g ou cm ²	5000 ufc/g ou cm ²	ISO 16649-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorer hygiène de production et sélection matières premières

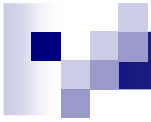
Plan d'interprétation à 3 classes : satisfaisant / acceptable / insatisfaisant

C, nombre maximum de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé.

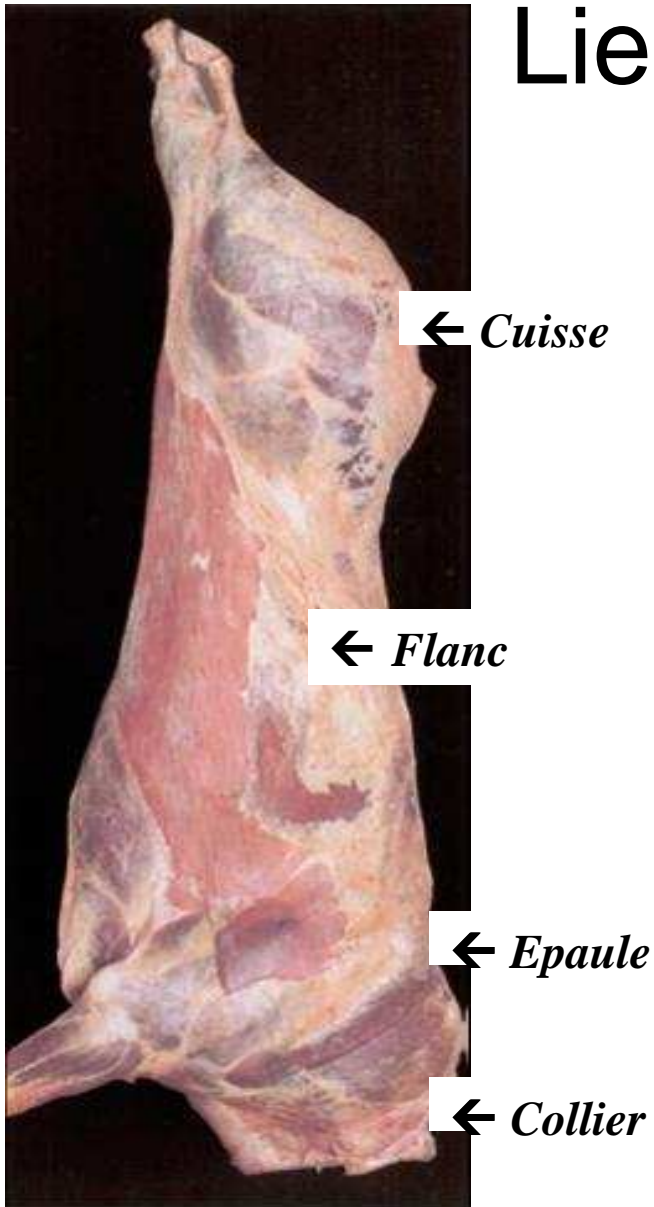


Prélèvements sur carcasse





Lieux de prélèvements



4 sites sur 5 carcasses

x 10 semaines

Montre hygiène abattoir

CARCASSES

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage		Limites		Méthode d'analyse de référence ³	Stade d'application du critère	Action en cas de résultat inacceptable
		n	c	m	M			
Carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés ⁴	Nombre de colonies aérobies			3,5 log ufc/cm ² moyen quotidien	5,0 log ufc/cm ²	ISO 4833	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorer l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
	Entérobactéries			1,5 log ufc/cm ² moyen quotidien	2,5 log ufc/cm ²	ISO 21528-2	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorer l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé

Plan d'interprétation à 3 classes (sur moyenne des log)
satisfaisant / acceptable / inacceptable

Examens Bactériologiques sur Carcasse

Pour vérifier et améliorer l'hygiène de l'abattoir

Pour quelles autres raisons ?

- Abattage animal accidenté
- Contrôle officiel si doute
 - Septicémie ou Tuberculose ?
 - Substance antimicrobienne ? (pvt = rein)
- Vétro Inspecteur peut le demander pour aide à la décision
- Carcasse gardée en consigne
Si deuxième examen défavorable = saisie totale





Questions d'interro possibles (exemples)

- Quels sont les 2 types de critère microbiol. définis par la réglementation européenne ?
Que signifient-ils? Donner pour chacun d'entre 2 exemples de bactéries concernées
- Citez 4 bactéries ou toxines recherchées dans les critères microbiologiques de sécurité
- Différences entre dénombrements bactériens en milieu liquide et en milieu solide, avantages-inconvénients, et type de résultat obtenu (on peut faire un schéma)
- Sur un exemple de numération en milieu solide (donné sur le sujet), trouver le nombre de bactéries par gramme d'aliment, et exprimez-le de façon standard
- Quelle bactérie et/ou famille de bactéries utilise-t-on en général comme indicateur de contamination fécale ? Donner trois facteurs qui permettent de sélectionner/distinguer cette bactérie/famille lors de sa numération sur boîte de pétri
- Combien de temps faut-il pour détecter et confirmer la présence de Salmonelle dans un aliment ?
- Quels sont les différents éléments pris en compte pour définir un critère microbiologique ?
- Différences entre plan à 2 classes et plan à 3 classes
- Que fait l'industriel qui constate lors d'un auto-contrôle qu'un aliment qu'il commercialise n'est pas satisfaisant pour un critère microbiologique de sécurité des aliments ?
- Que signifie "Plan à 3 classes" pour l'interprétation des résultats de l'analyse bactériologique d'un lot d'aliment ? Définissez m, M, n et c.
- Comment contrôle-t-on la qualité bactériologique des carcasses dans un abattoir ?
- Interpréter les résultats d'une analyse microbiologique (sur un exemple). Le plan réglementaire d'interprétation sera donné sur le sujet d'examen : inutile de le savoir par cœur !