

« Confiez vos analyses
de contaminants
à un **spécialiste** »

MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE



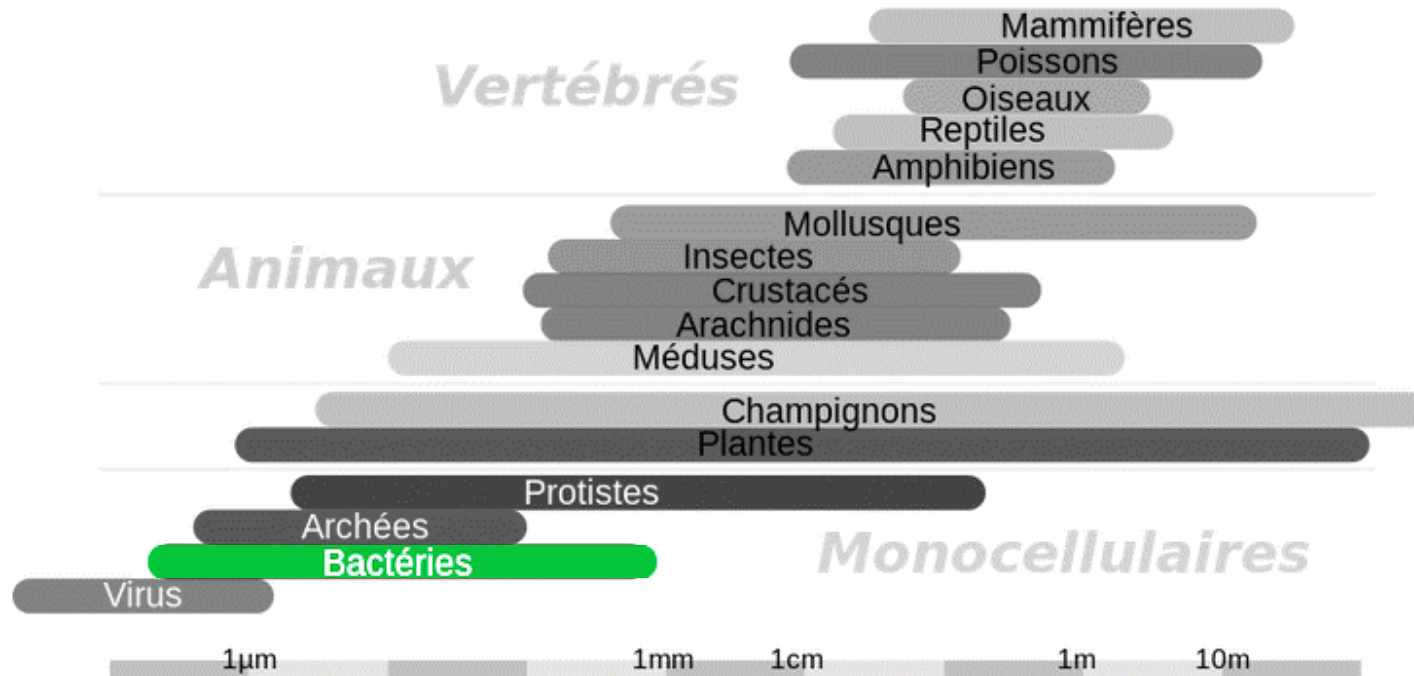
Sommaire

1. Informations générales sur la microbiologie
2. Sécurité alimentaire
3. Plan de contrôle
4. Méthodes d'analyse microbiologiques
5. Analyses au laboratoire



Informations générales sur la Microbiologie

- Les micro-organismes ne se voient pas à l'œil nu et ont besoin de chaleur, de nourriture et d'humidité pour vivre



INFORMATIONS GENERALES SUR LA MICROBIOLOGIE

- On peut différencier 3 grandes familles de micro-organismes:
 - Les bactéries
 - Les virus
 - Les champignons, levures et moisissures

- Danger microbiologiques dans le secteur alimentaire = présence de micro-organismes dans les denrées, sur les emballages, sur le matériel, sur les mains des personnes en contact avec les denrées alimentaires
 - Conséquence possible du développement microbien sur les aliments = maladies ou intoxication alimentaire

Populations à risque

Personnes âgées

Enfants

Personnes immunodéprimées



Sécurité alimentaire

- Les analyses microbiologiques des aliments permettent d'évaluer:
 - Le risque pour le consommateur
 - La stabilité et la durée de vie des produits dans des conditions normales de stockage
 - Le respect des bonnes pratiques d'hygiène aux différentes étapes de la chaîne de production

Tous les professionnels de l'alimentation sont concernés par les analyses microbiologiques: industries agroalimentaires, producteurs agricoles, restauration collective, restauration commerciale, bouchers, boulangers, traiteurs, poissonniers, etc...

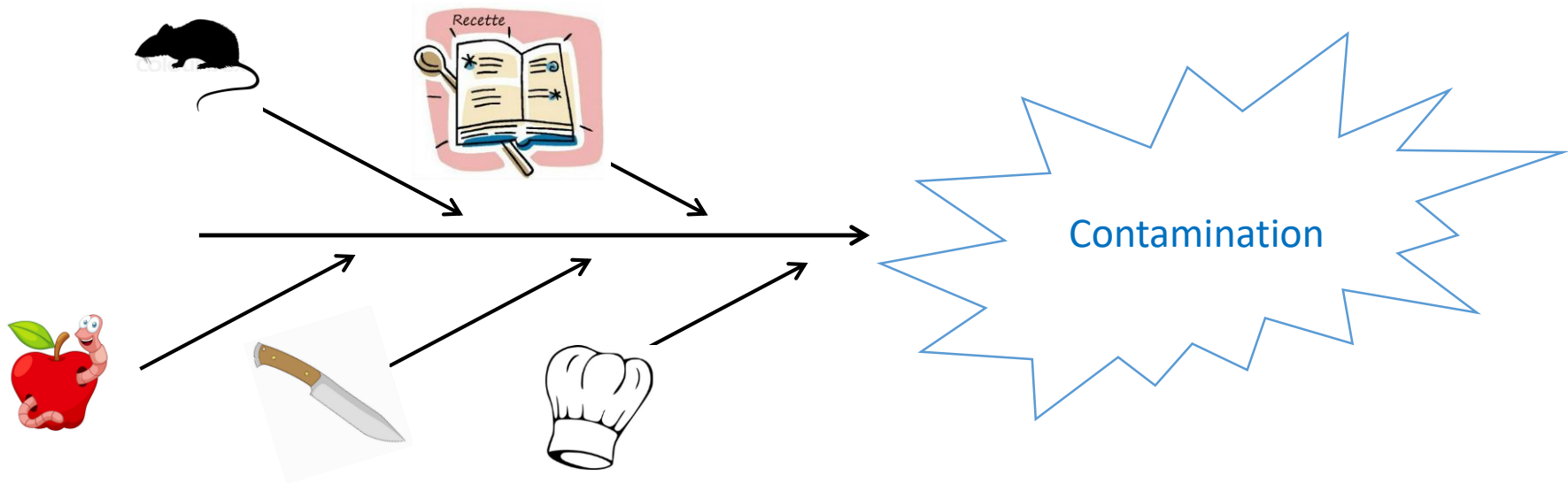
Manque de maîtrise du risque microbiologique

Impact direct sur la santé des consommateurs

Impact indirect économique pour les acteurs
de la filière alimentaire

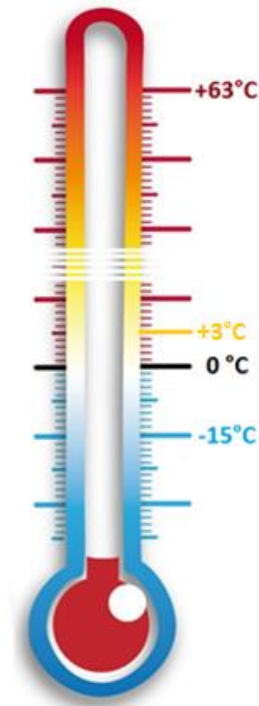


CAUSES DE CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE



FACTEURS FAVORISANT LE DEVELOPPEMENT MICROBIEN

- Le **temps**: les micro-organismes se reproduisent très vite
- La **température**:
 - Au dessus de 63°C:
 - La majorité des bactéries est tuée
 - Entre 3 et 63°C
 - Les bactéries se multiplient
 - En dessous de 3°C:
 - Les bactéries ne se multiplient pas





Plan de contrôle

Elaboration d'un plan de contrôle

Dispositions réglementaires du Paquet Hygiène imposent mise en place d'un PMS prenant en compte les BPH et les procédures basées sur l'HACCP

- Réaliser une analyse des dangers
- Définir moyens de prévention pour la maîtrise des dangers

Analyses bactériologiques = vérifier efficacité des mesures préventives mise en place en amont



PLAN DE CONTROLE

Choix des fréquences d'analyse

- Nombre de produits à analyser et fréquence d'analyse non précisés dans les textes réglementaires,
- Préconisation mise en place d'un plan d'auto-contrôles basé sur principes méthode HACCP,
- A définir par l'exploitant selon:
 - le volume d'activité
 - le type de consommateurs
 - Les changements d'organisation

PLAN DE CONTROLE

Choix des micro-organismes

- Critères réglementaires ou recommandations
- Germes indicateurs d'hygiène pertinents et flore d'altération
- (Exigences des clients)

CRITERES MICROBIOLOGIQUES

- **Critères microbiologiques** applicables aux denrées alimentaires:
Règlement (CE) N°2073/2005 et ses modifications

CRITERE DE SECURITE

Acceptabilité du produit

Concerne les contaminations par des micro-organismes **mettant en danger la vie** des consommateurs



CRITERE D'HYGIENE

Acceptabilité des bonnes pratiques du procédé de production

Concerne les contaminations ou le développement de microorganismes au cours du procédé de production =>
Synonyme d'un **non respect des bonnes pratiques d'hygiène**



CRITERES MICROBIOLOGIQUES

- Exemples de **critères de sécurité** (pour les micro-organismes pathogènes):



Œufs, viandes,
végétaux (graines
germées), coquillages,
etc.



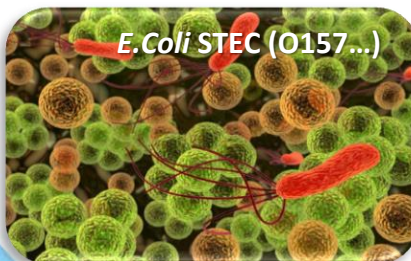
ABSENCE dans 10 g ou 25 g



Produits laitiers,
poissons, coquillages,
crudités, charcuterie,
etc.



ABSENCE ou max 100 ufc/g



Produits laitiers,
viande hachée,
végétaux crus, dérivés
de F&L non
pasteurisés, etc.



Pas de critère de sécurité dans le
règlement (CE) n°2073/2005 mais
peut faire l'objet d'une procédure de
retrait/rappel au titre de l'article 14
du règlement (CE) n°178/2002.

= **Denrées impropres à la consommation**: notre laboratoire vous informe en urgence afin que vous puissiez déclencher le retrait ou le rappel des produits.

PLAN DE CONTROLE

Réglementation:

- Règlement (CE) n°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

Recommandations:

- Guides des bonnes pratiques d'hygiène par secteur (BPH)
- Avis de l'association française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA)
- Critères d'hygiène des procédés définis par les interprofessions par secteur
- Critères proposés par la fédération du commerce et de la distribution (applicables aux grandes et moyennes surfaces)

EXEMPLE DE CRITERES MICROBIOLOGIQUES

Afssa – Saisine n° 2007-SA-0174

Saisine liée n° 2006-SA-0215

I. Produits végétaux crus (fruits et légumes) - Commerce de détail

DESIGNATION	Champ d'application	Plan échantillonnage	Micro-organismes aérobies à 30°C par gramme	Flore lactique par gramme	<i>E. coli</i> par gramme	Staphylocoques coagulase + par gramme	Levures & moisissures par gramme	<i>Salmonella</i> dans 25 g	Commentaires sur les critères proposés
Végétaux crus (ni râpés, ni émincés) non assaisonnés	GMS Fabrication	n=1, c=0	500 000 (3)	-	10	-	-	Absence	Le seuil proposé pour <i>E. coli</i> en GMS Fabrication est inférieur à celui du règlement (100). Il serait judicieux d'harmoniser les limites du critère <i>E. coli</i> à 100.
	GMS MeV		50 000 000 (3)	-	100	-	-	Absence	
	Rest. Collective		50 000 000 (3)	-	50	100	-	Absence	
Légumes râpés ou émincés non assaisonnés	GMS Fabrication		-	100 000 (3)	10	-	-	Absence	Il serait judicieux de proposer des critères pour les microorganismes aérobies à 30°C. Il serait judicieux d'harmoniser les limites du critère <i>E. coli</i> à 100.
	GMS MeV		-	1 000 000 (3)	100	-	-	Absence	
	Rest. Collective		-	1 000 000 (3)	50	100	-	Absence	
Mélanges de fruits frais et jus de fruits frais non pasteurisés	GMS Fabrication		-	1 000 (3)	10	-	1 000 (3)	Absence	Le seuil proposé pour <i>E. coli</i> en GMS Fabrication est inférieur à celui du règlement (100). Il serait judicieux d'harmoniser les limites du critère <i>E. coli</i> à 100.
	GMS MeV		-	10 000 (3)	100	-	10 000 (3)	Absence	
Mélange de fruits frais	Rest. Rapide		-	10 000 (3)	10	-	50 000	Absence	Les critères proposés pour les salades de fruits frais au stade de la restauration rapide ne sont pas cohérents avec ceux proposés au stade de la mise en vente (Cf. ligne ci-dessus).
Jus de fruits à base de concentré reconstitué sur site	Rest. Rapide		-	10 000	10	-	10 000	-	Il ne s'agit pas de fruits et légumes crus. Le maintien de ce type de produits dans la catégorie n'est pas totalement approprié.

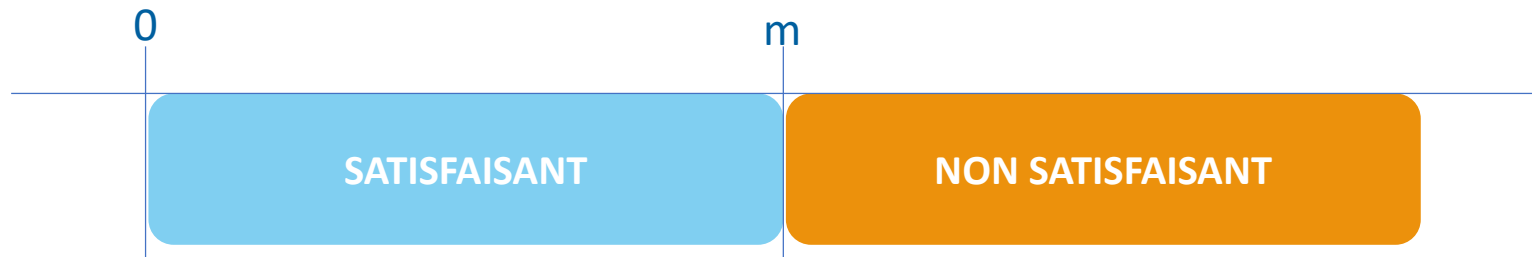
Critère de sécurité du règlement (CE) n°2073/2005

(3) Critère proposé à titre transitoire sous réserve de validation dans 12 mois.

PLAN A 2 CLASSES

Par défaut: plan d'échantillonnage selon **plan à 2 classes** $n=1$

- n : nombre d'unité d'échantillonnage
- m : critère fixé (=critère cible)



EXEMPLE DE CRITERES MICROBIOLOGIQUES

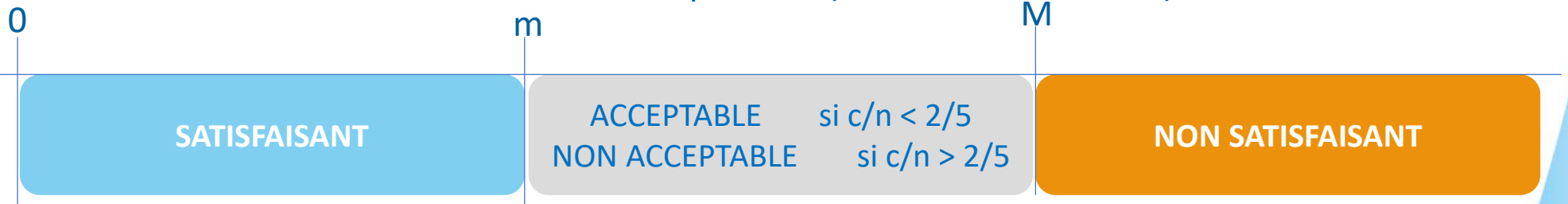
**Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005
concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires
(JOUE du 22/12/2005)**

2.5 *Légumes, fruits et produits à base de légumes et de fruits*

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage ⁽¹⁾		Limites		Méthode d'analyse de référence ⁽²⁾	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.5.1 Fruits et légumes prédécoupés (prêts à être consommés)	<i>E. coli</i>	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et de la sélection des matières premières

PLAN A 3 CLASSES

- n : nombre d'unité d'échantillonnage (en général échantillons du même lot)
- c : nombre d'unités donnant des résultats compris entre m et M (en général 2)
- m : critère fixé (=critère cible)
- M : seuil maximum ou limite d'acceptabilité (=tolérance maximale)



Méthodes d'analyse microbiologiques



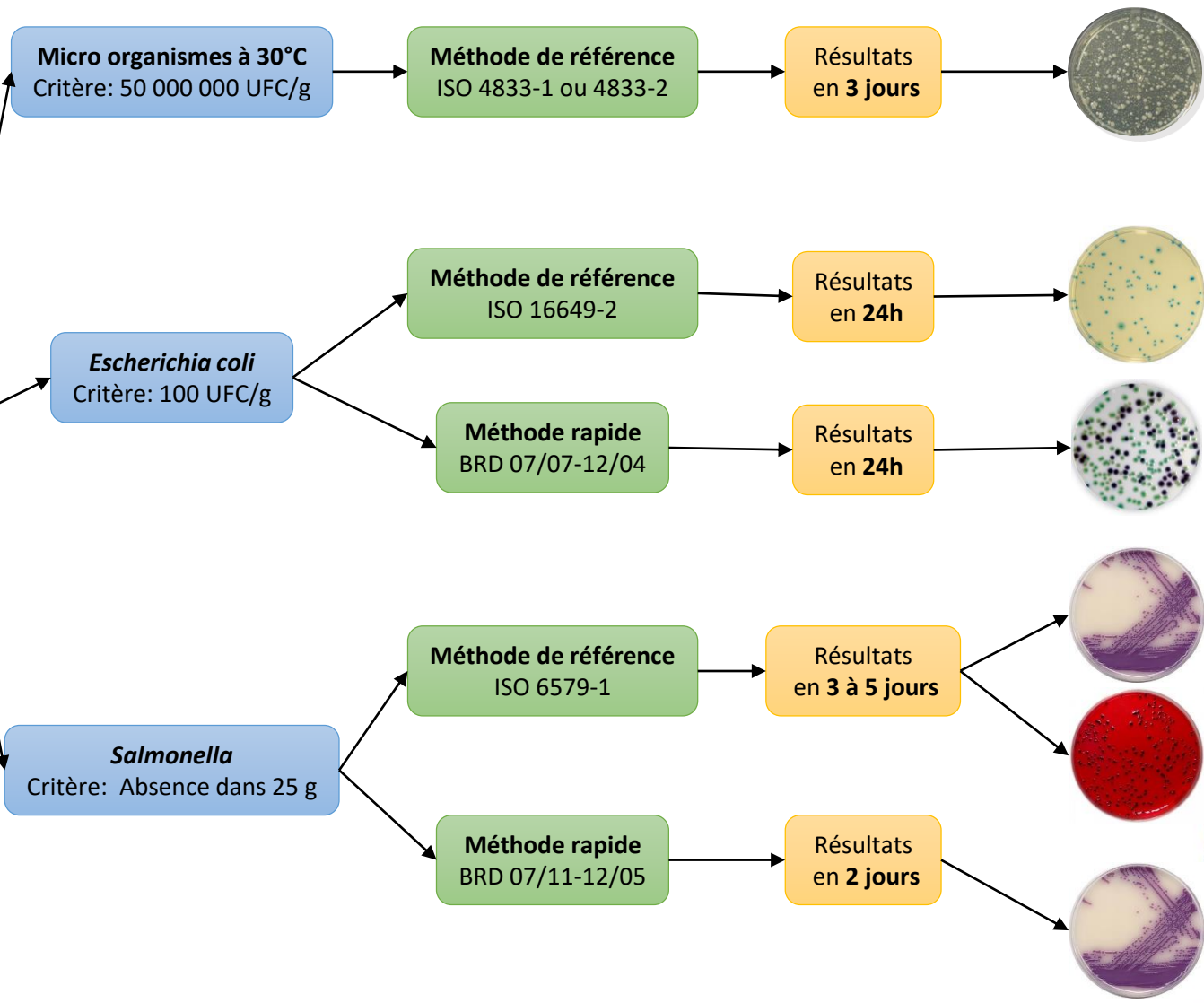
- Recherche des **microorganismes pathogènes**
Par exemple *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*... par méthodes culturales ou immunologiques
 - Dénombrement des **microorganismes indicateurs d'hygiène** ou de qualité du process
Par exemple : entérobactéries, coliformes et staphylocoques à coagulase positive
- **Méthodes de référence** en vigueur (ISO, EN, NF)
 - **Méthodes rapides** validées conformément au protocole défini dans la norme NF EN ISO 16140 (ex: méthodes certifiées par AFNOR Validation)



Framboises

À l'étape
de mise en vente GMS

Critères de l'avis de l'AFSSA
Saisine n° 2007-SA-0174

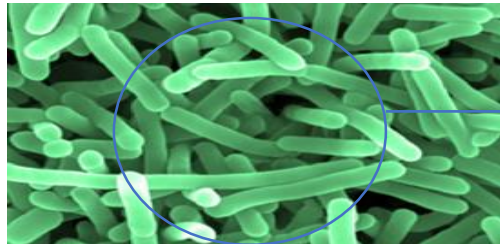


EXPRESSION DES RESULTATS

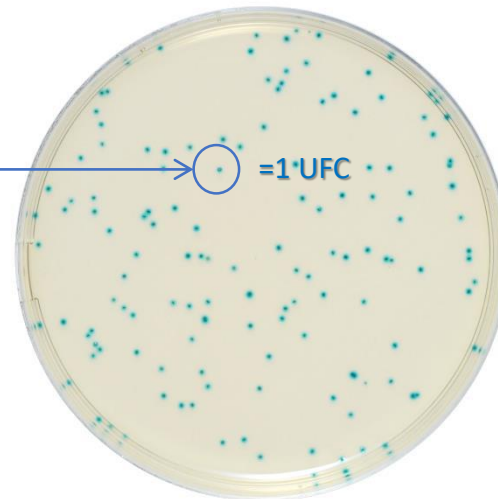
- UFC/g: unité utilisée en microbiologie pour l'expression des résultats



1 bactérie
(au microscope)



plusieurs bactéries
regroupées
(au microscope)

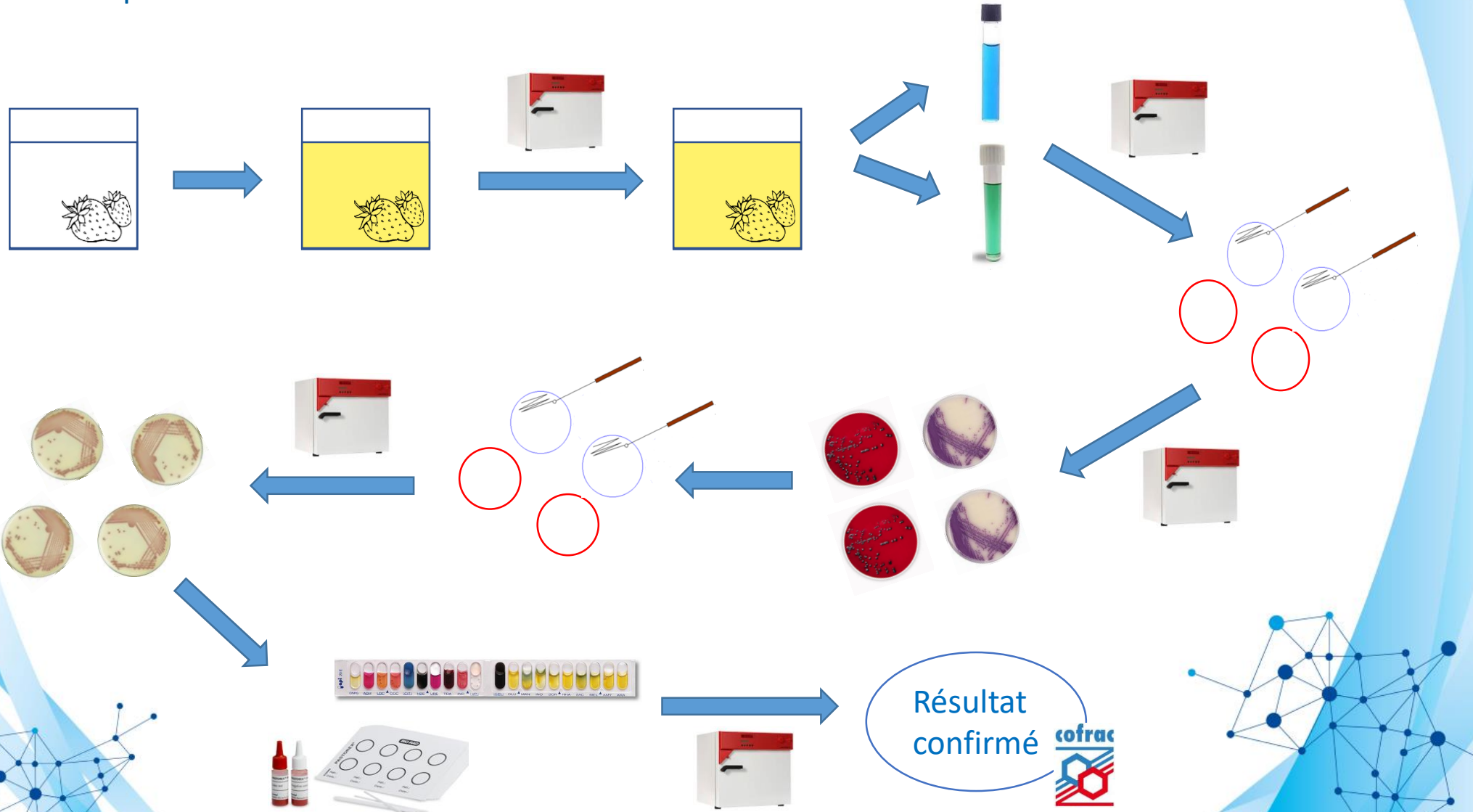


138 UFC
(à l'œil nu sur boîte de Pétri)

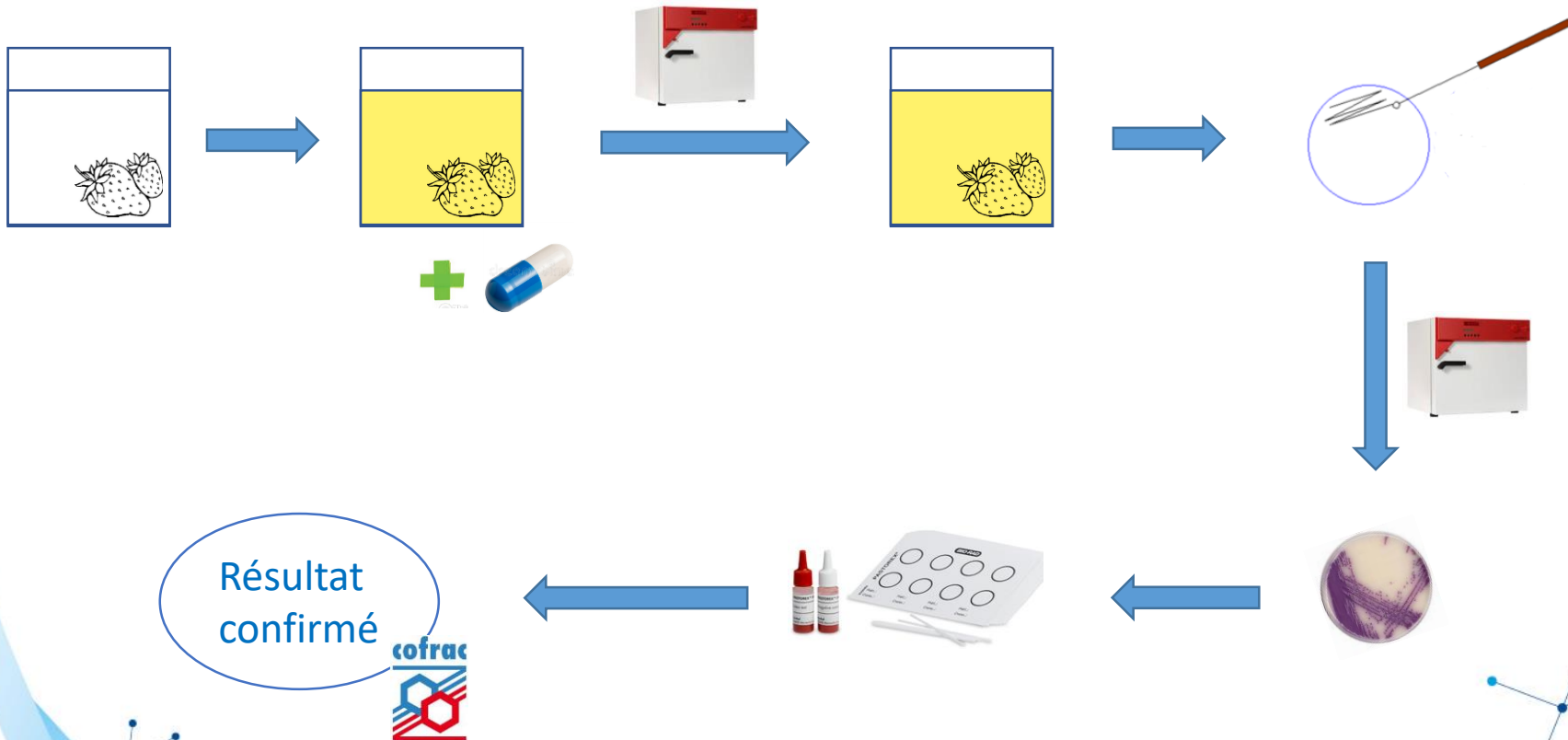


Ramené ensuite au nombre
d'**Unités Formant Colonies**
par gramme d'échantillon

- Exemple d'une recherche de Salmonella selon la **méthode de référence**



- Exemple d'une recherche de Salmonella selon la **méthode alternative rapide**



OFFRE MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

Dénombrement de germes

Micro-organismes à 30°C



Micro-organismes à 55°C

Pseudomonas spp

Staphylocoques à coagulase positive

Levures et moisissures



Levures moisissures méthode rapide

Listeria spp et monocytogenes



ASR thermophiles à 50°C

ASR 37°C



Spores d'ASR mésophiles

ASR 46°C



Spores d'ASR thermophiles

Bacillus cereus



Spores de *Bacillus cereus*

Clostridium perfringens



Spores de *Clostridium perfringens*

Coliformes à 30°C, 37°C et 44°C

Entérobactéries

Escherichia coli

Flore lactique

Recherche de germes

Listeria spp et monocytogenes

Salmonella spp

Escherichia coli O157



E.Coli O157 par
Immunofluorescence

Bacillus cereus présomptifs

ASR à 46°C

Bactéries gram – résistantes
aux sels biliaires

Candida albicans

Clostridium perfringens

Coliformes

Entérobactéries à 30°C et
37°C

Escherichia coli

Pseudomonas spp

Staphylocoques à coagulase
positive

OFFRE MICROBIOLOGIE DES EAUX

Dénombrement de germes

Micro-organismes revivifiables à 22°C

Micro-organismes revivifiables à 36°C

Escherichia coli



Escherichia coli par méthode npp

Coliformes



Enterocoques intestinaux par méthode npp

Pseudomonas aeruginosa

Staphylocoques à coagulase positive

Entérocoques intestinaux

Spores de micro-organismes anaérobies sulfite réducteurs



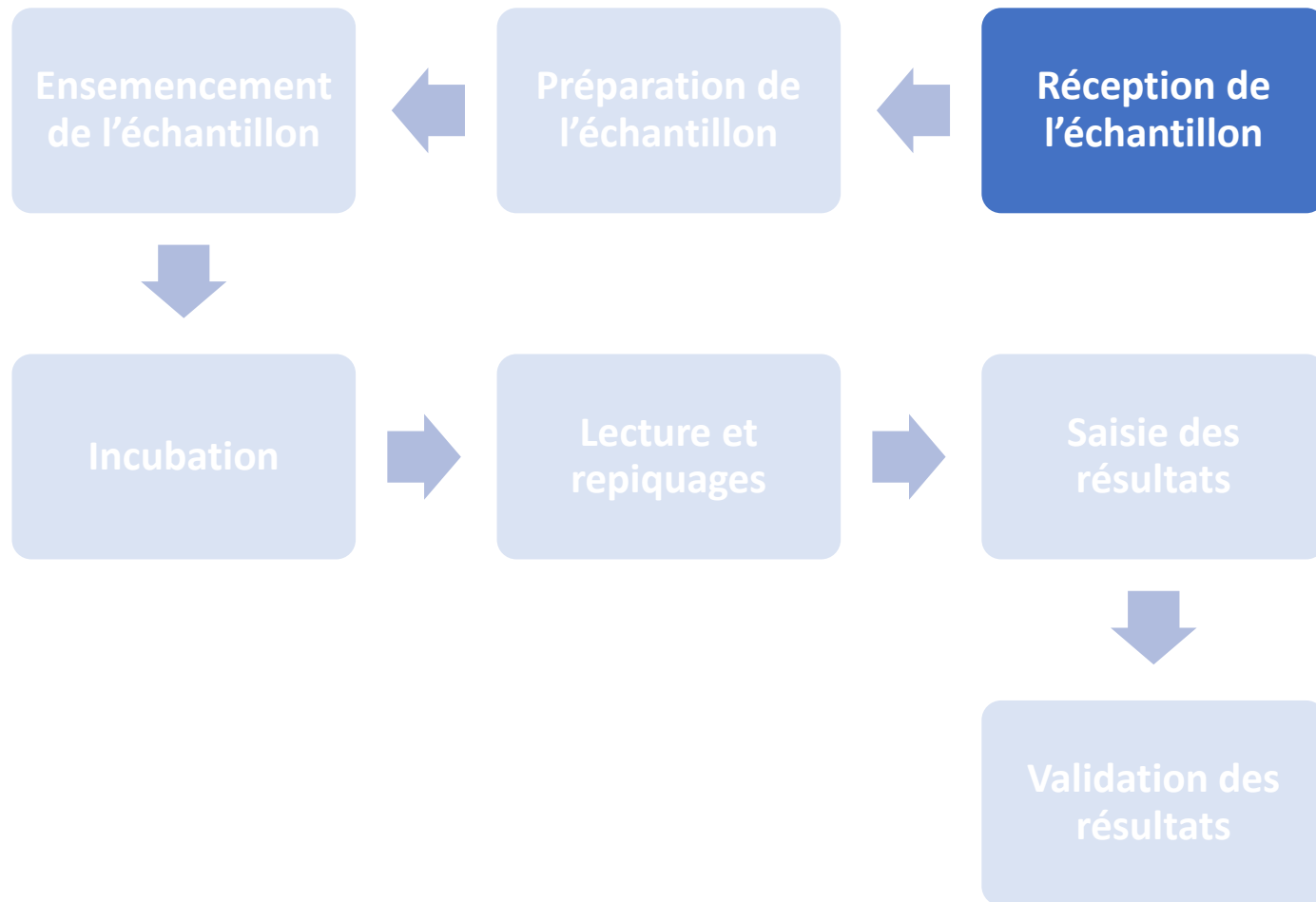
Legionella spp et *Legionella pneumophila*

Analyses au laboratoire

Réception de
l'échantillon



SCHEMA D'ANALYSE

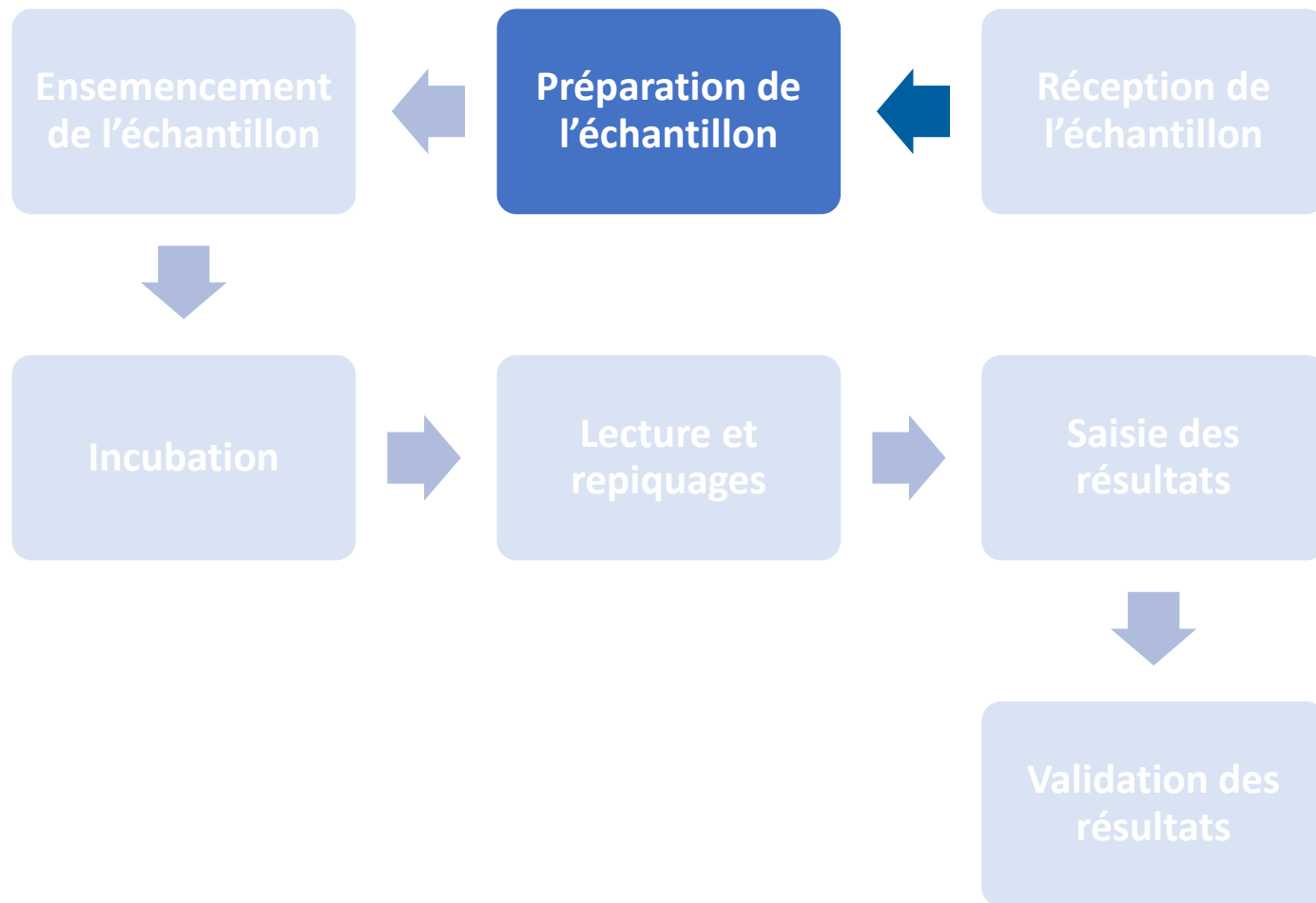


RECEPTION



- Contrôles à réception:
Température – Quantité - Conditionnement
- Vérification et validation du forfait par le secrétariat technique
- Acheminement vers le laboratoire de microbiologie

► Préparation de l'échantillon



PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- Selon la série de normes NF EN ISO 6887

Traitement préalable à la dilution

(selon la matrice: mélange, broyage, échantillonnage, agitation)

Dilution avec un diluant adapté à l'aide d'un diluteur péristaltique

(selon l'analyse demandée: Fraser ½ pour la recherche de *Listeria*, eau peptonée tamponée pour la recherche de *Salmonella* et les autres germes)

Homogénéisation



Sac filtre de dilution

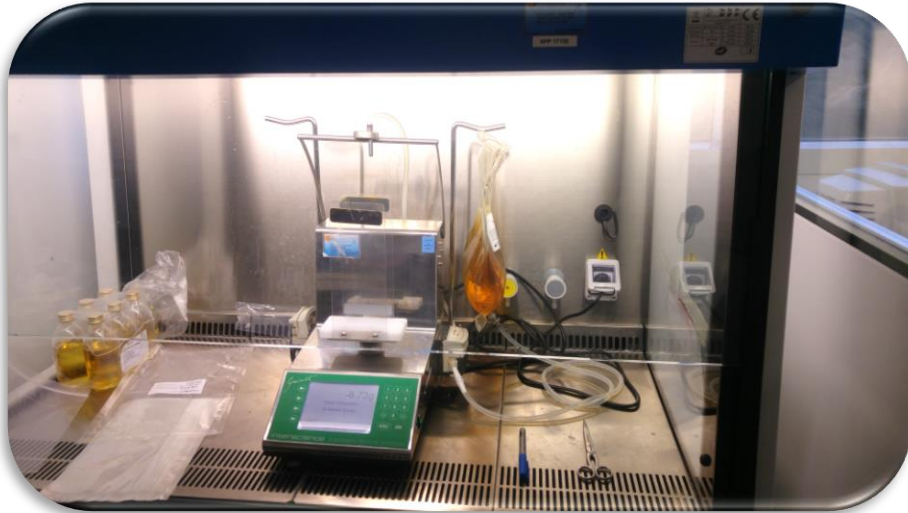


Automate de dilution



Malaxeur

PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON



Automate de pesée et dilution sous poste de sécurité microbologique

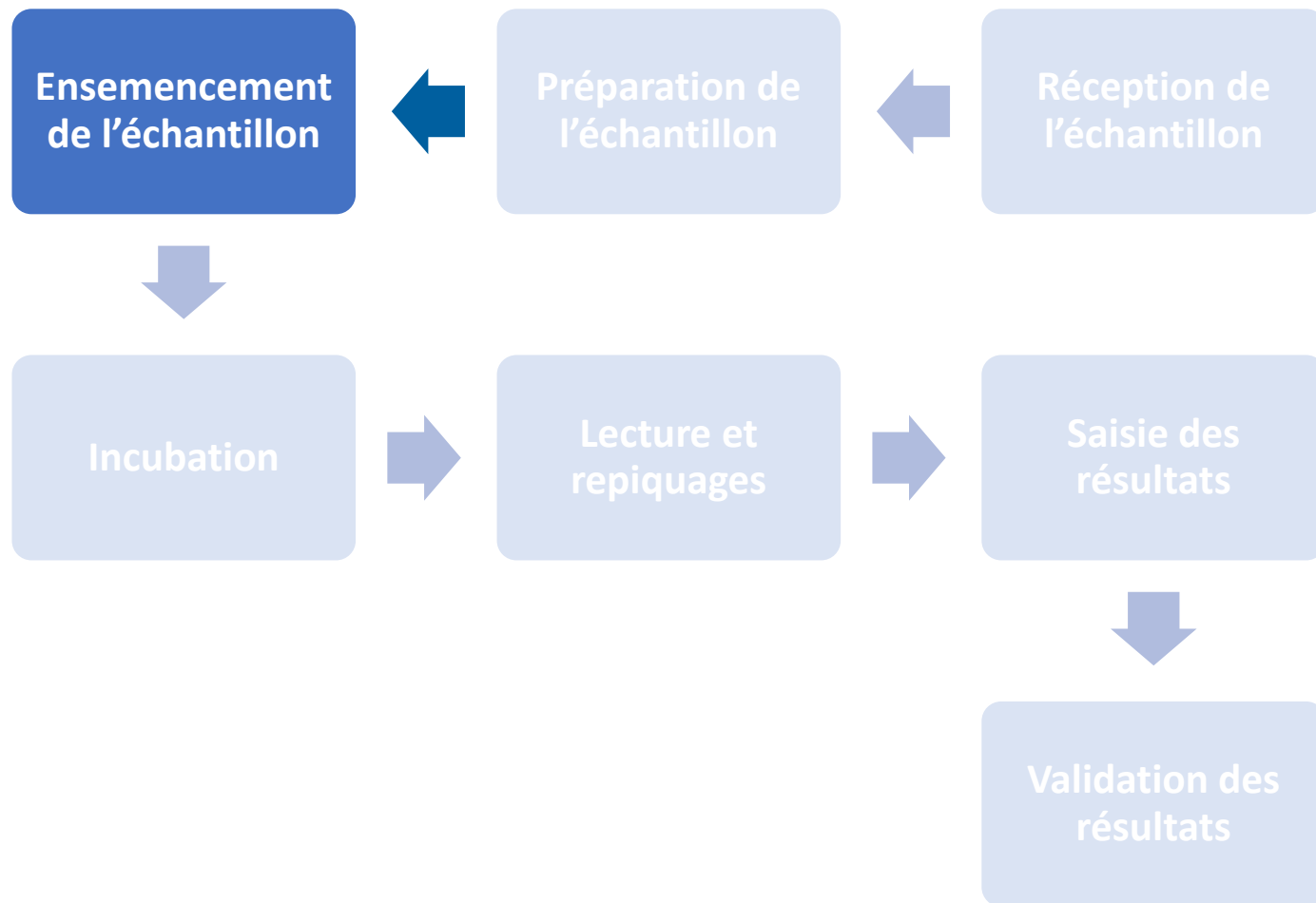


Echantillons dilués en sacs filtres

► **Ensemencement de l'échantillon**



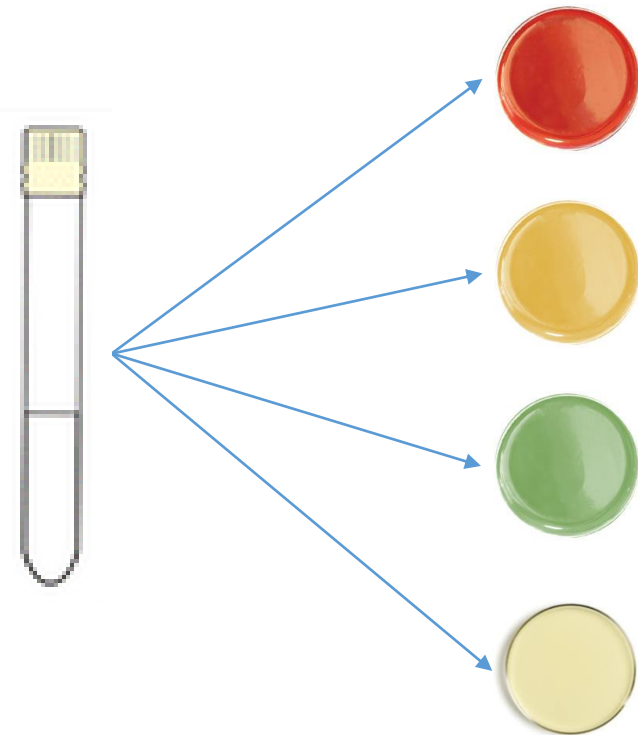
SCHEMA D'ANALYSE





ASBA001-1.jpg

ENSEMENCEMENT DE L'ÉCHANTILLON



Sur des boîtes de pétri contenant des milieux de culture spécifiques à chaque germe

Exemple:

PCA pour la flore totale,

YGC ou DG18 pour les levures et moisissures,

VRBG pour les entérobactéries,

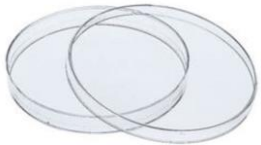
BP + RPF pour les Staphylocoques à coagulase + ...



ENSEMENCEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Pour les analyses de dénombrement:

- Méthode d'ensemencement en profondeur



Dépôt d'1 mL de la dilution d'échantillon au fond d'une boîte de pétri et ajout du milieu gélosé en surfusion

- Méthode d'ensemencement en surface



Dépôt de 100 μ L de la dilution d'échantillon sur la surface de la gélose d'une boîte de pétri déjà coulée



ENSEMENCEMENT DE L'ÉCHANTILLON



Ensemencement en profondeur



ENSEMENCEMENT DE L'ÉCHANTILLON



Flacons de milieu gélosé en surfusion dans un bain marie



ENSEMENCEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Pour les analyses de recherche:

- Enrichissement avec diluant spécifique



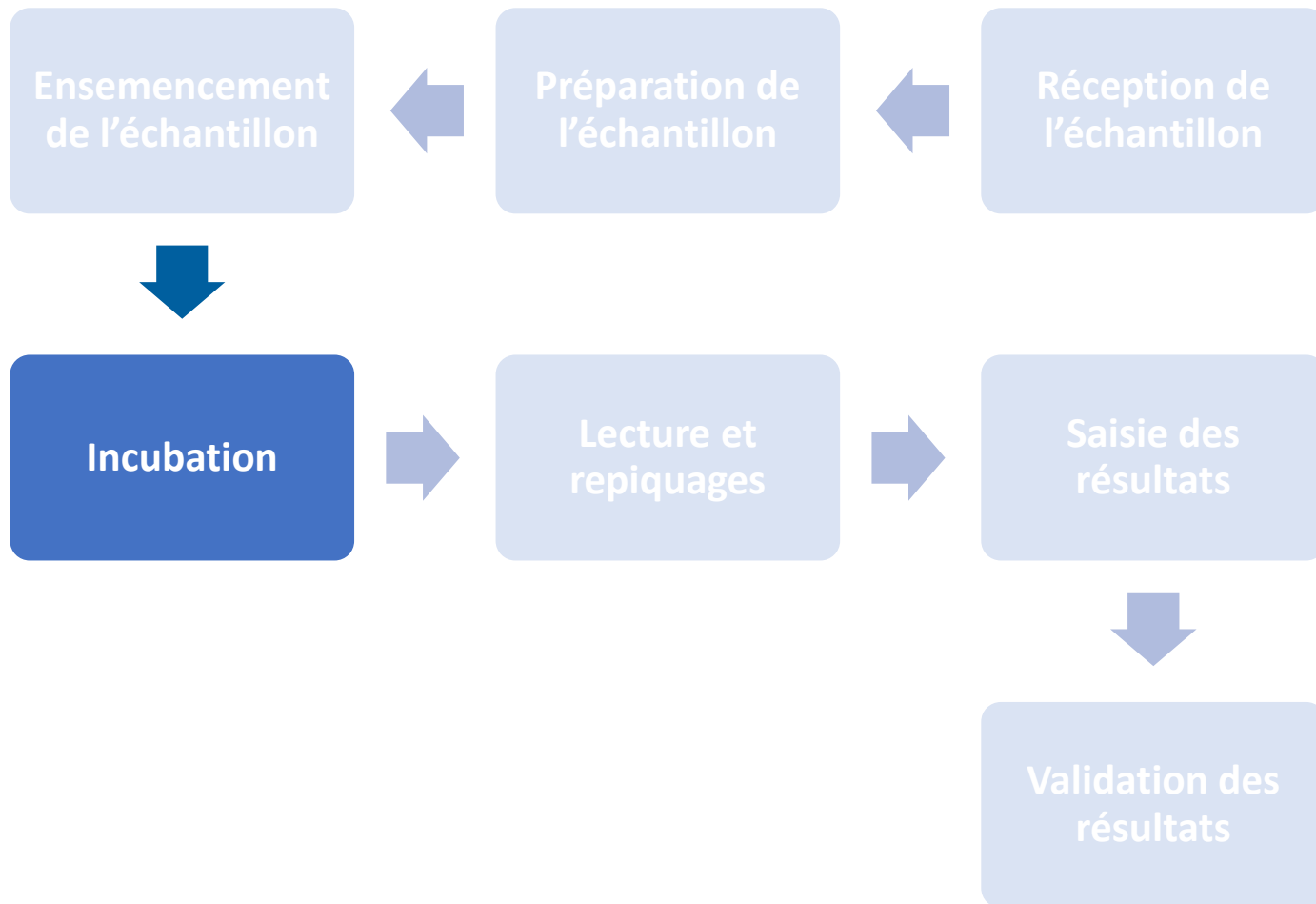
Echantillons en sachets dilués au dixième

▶ Incubation

Méthodes de recherche

Détection de germes
présents en faible quantité





INCUBATION

- Etuves réglées aux températures de croissance de chaque micro-organisme
- Capacité d'incubation adaptée à la prise en charge d'échantillons quotidiennement
- Etuves cartographiées en 9 points par le service métrologie du laboratoire

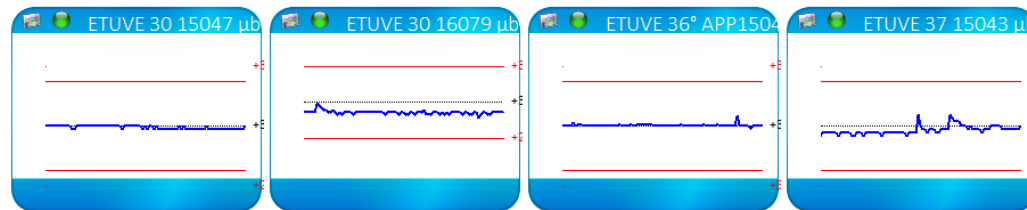


INCUBATION

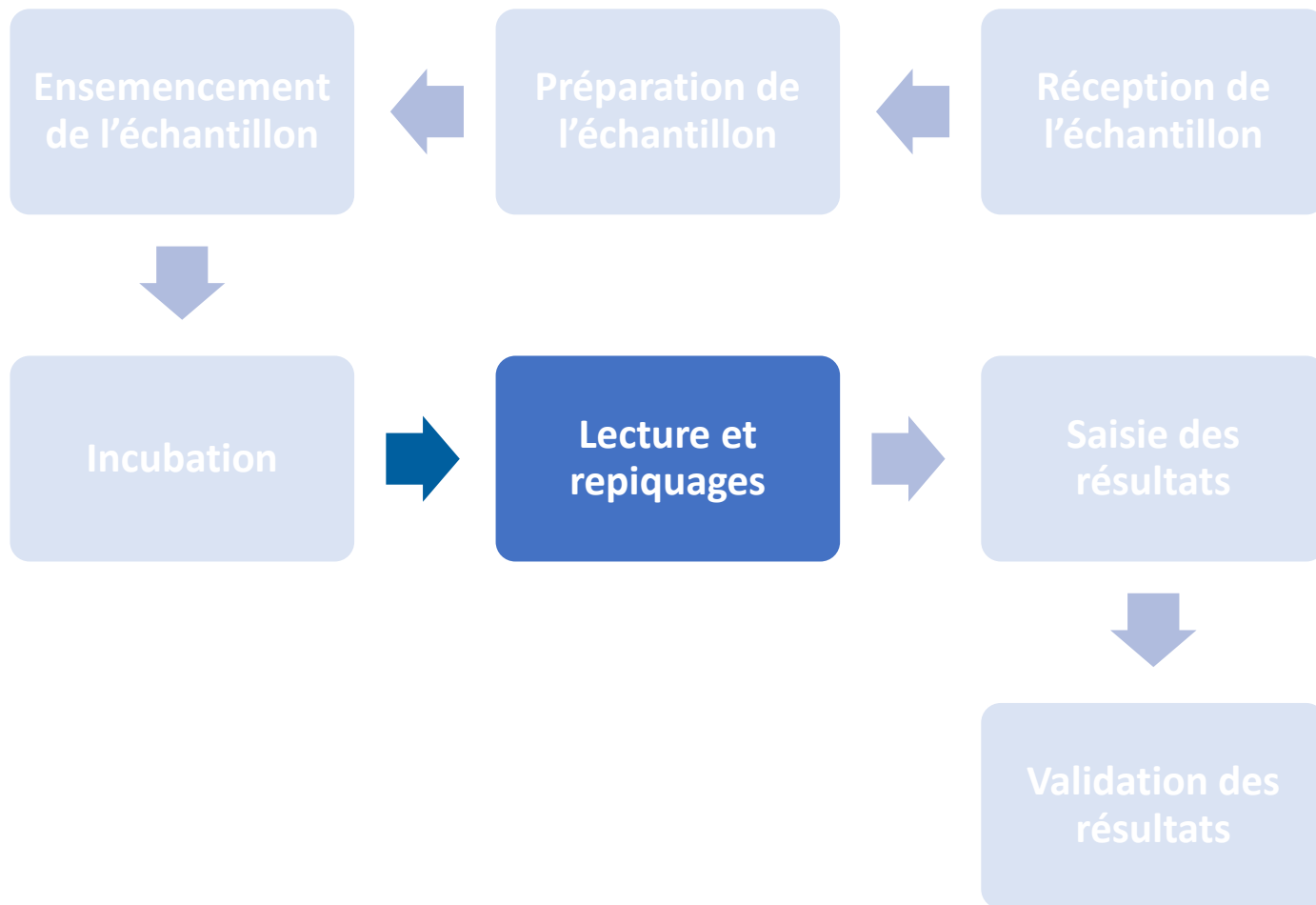
- Suivi des **durées d'incubation** en temps réel



- Suivi des **températures d'incubation** en temps réel



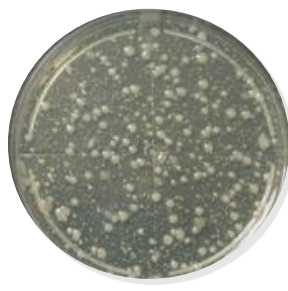
▶ Lectures et repiquages



LECTURES ET REPIQUAGE



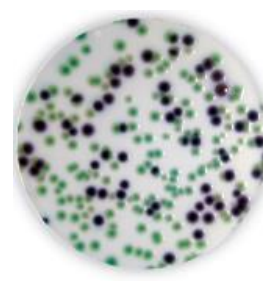
NF EN ISO 7932



NF EN ISO 4833-2



NF ISO 16649-2



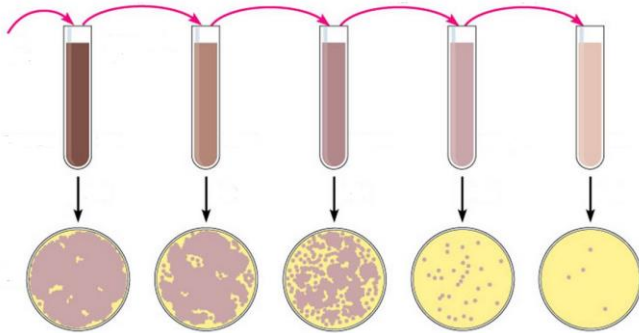
BRD 07/07-12/04
Milieu Rapid'E.coli



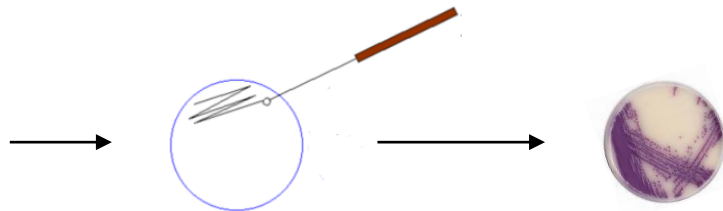
BRD 07/11-12/05
Milieu Rapid'
Salmonella

LECTURES ET REPIQUAGE

Pour les analyses de dénombrement:



Pour les analyses de recherche



→ Calcul des résultats

Résultat chiffré
en quantité d'UFC/g

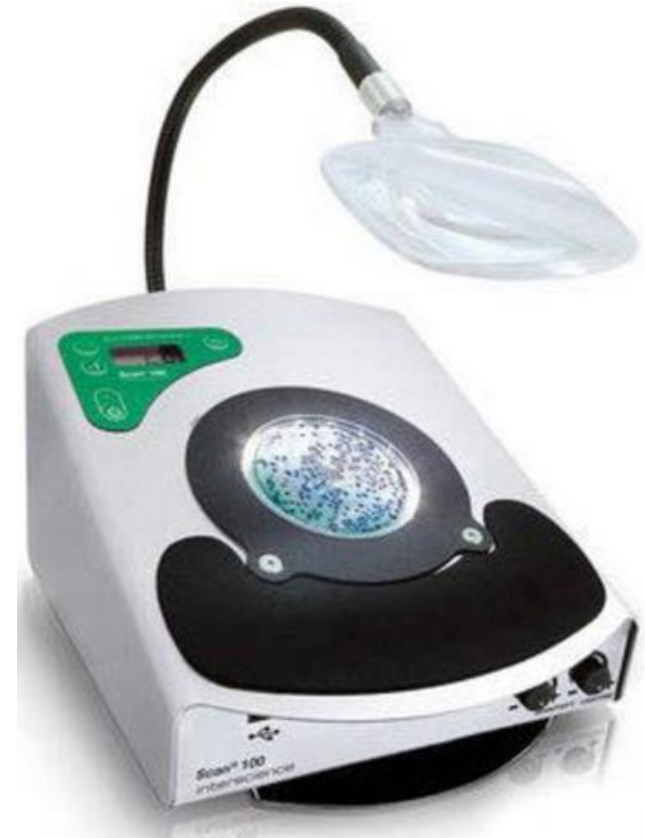
→ Tests de confirmation

Résultat
Absence ou Présence/Xg

LECTURES ET REPIQUAGE

Repiquages pour confirmations

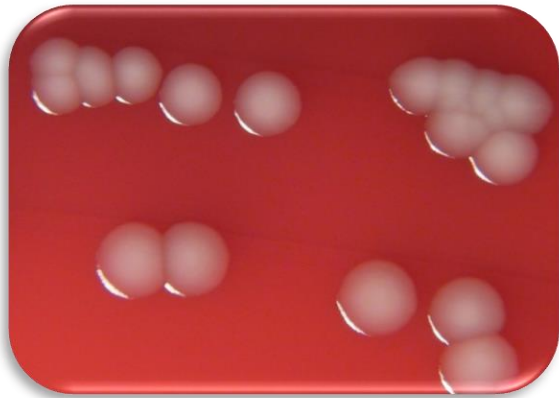
- Repiquage sur milieu de culture différent
- Repiquage en tube
- Observations macroscopiques
- Observations microscopiques
- Tests biochimiques



Compteur de colonies automatique

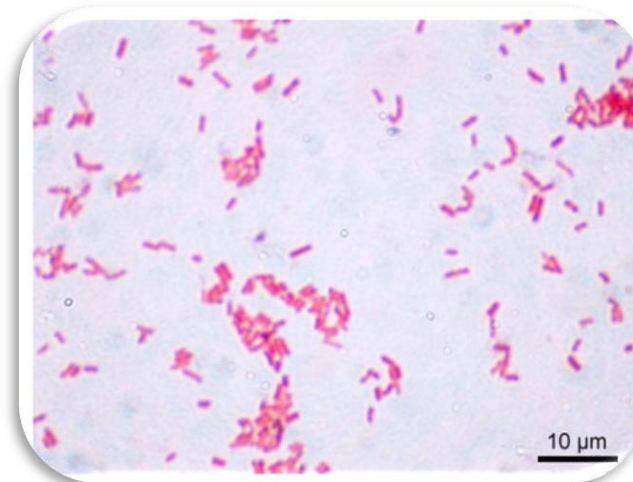
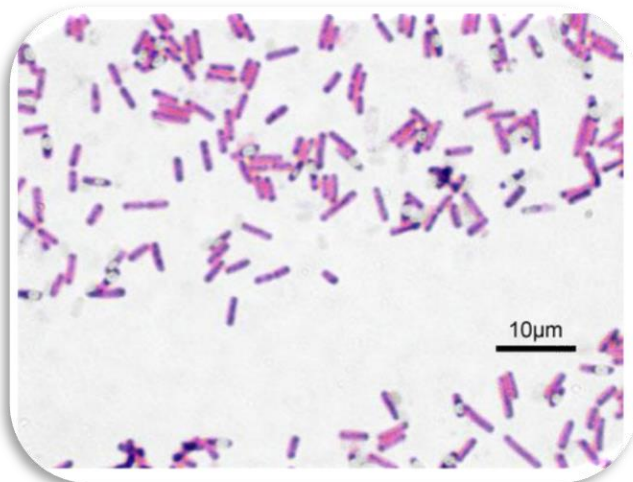
LECTURES ET REPIQUAGE

Observations macroscopiques



LECTURES ET REPIQUAGE

Observations microscopiques



LECTURES ET REPIQUAGE

- Repiquage sous PSM



LECTURES ET REPIQUAGE

Tests biochimiques

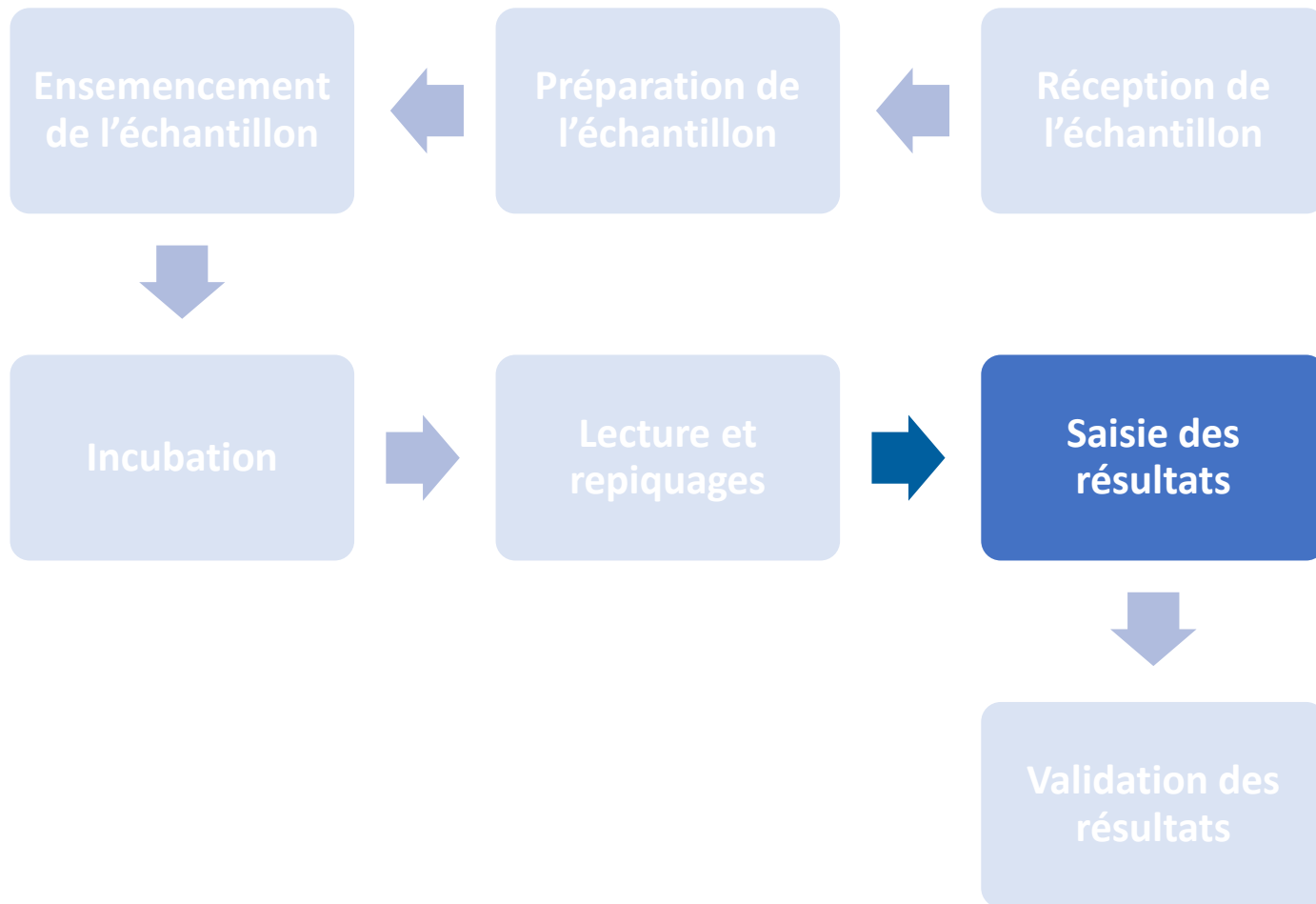
- En galerie d'identification



- En tubes







► Saisie des résultats



SAISIE DES RESULTATS

- Résultat saisi informatiquement

<input type="checkbox"/>	Numéro échantillon	Fiche échantillon	Matrice	Date de réception	Paramètre	MOC	Première dilution	Dernière dilution	Résultat Final	Calcul	Validation 2eme Lecteur	Mise en validation technique
<input type="checkbox"/>	18/PN024406	0 info(s) 	vinasses concentrées	2018-03-06 10:54:28	Salmonella spp.	MOC3205	A saisir	A saisir		+		
<input type="checkbox"/>	18/PN024462	3 info(s) 	Torta de grasol FEED	2018-03-06 11:26:23	Clostridium perfringens à 37°C	MOC3216	10 ⁻¹	10 ⁻²		+		
<input type="checkbox"/>	18/PN024462	3 info(s) 	Torta de grasol FEED	2018-03-06 11:26:23	E.coli B-glucuronidase+37°C	MOC3224	10 ⁻¹	10 ⁻²		+		
<input type="checkbox"/>	18/PN024462	3 info(s) 	Torta de grasol FEED	2018-03-06 11:26:23	Salmonella spp.	MOC3205	A saisir	A saisir		+		

- Calculs automatiques

C1:

C2:

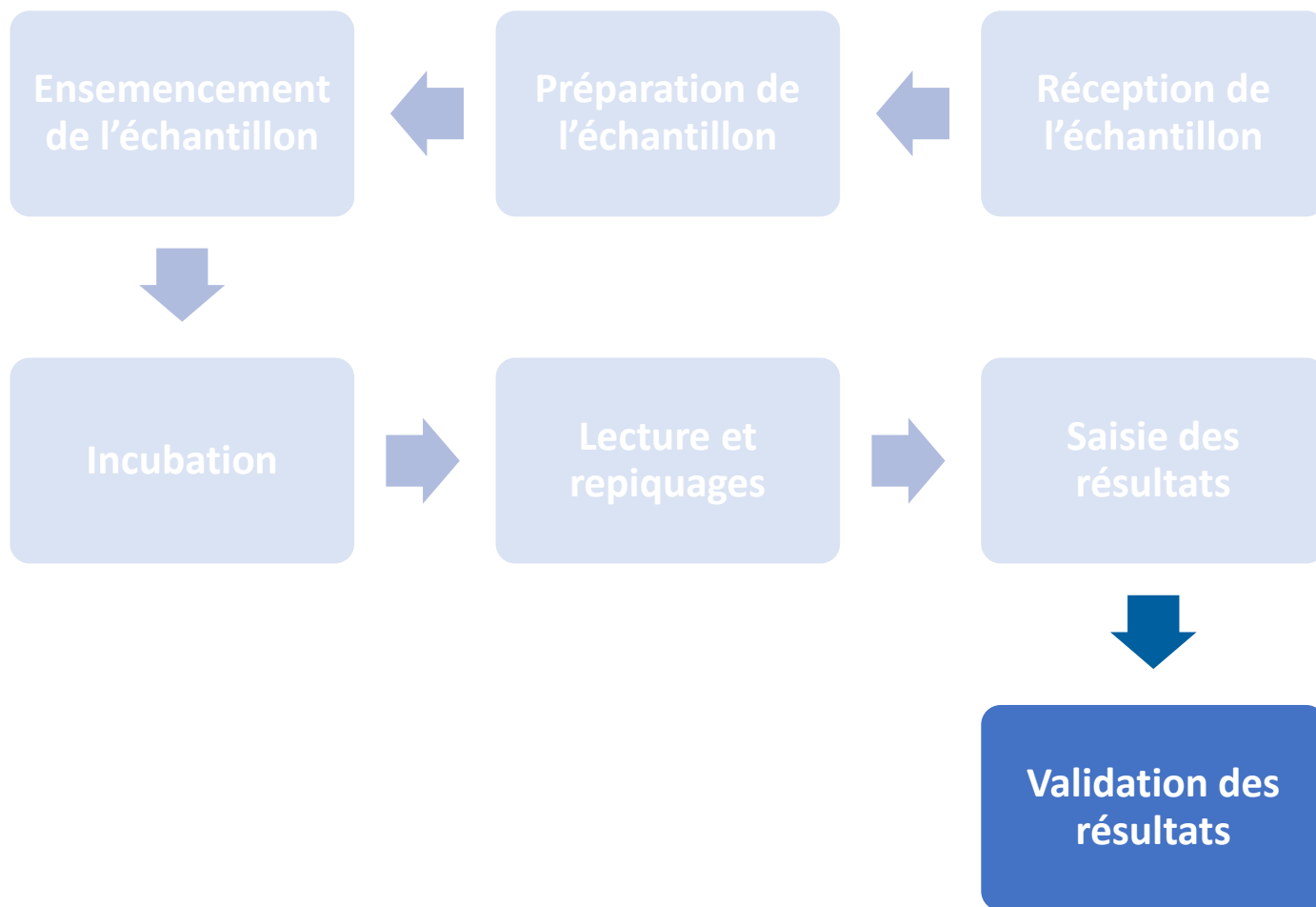
Nombre repiqué A1:

Nombre repiqué A2:

Nombre positif b1:

Nombre positif b2:

► Validation des résultats



Merci de votre attention !



Sophie DUSSARGUES
Service Microbiologie

Retrouvez-nous sur

www.phytocontrol.com

