



# EXAMEN BACTERIOLOGIQUE

---

Denrées alimentaires  
d'origine animale

# PLAN

---

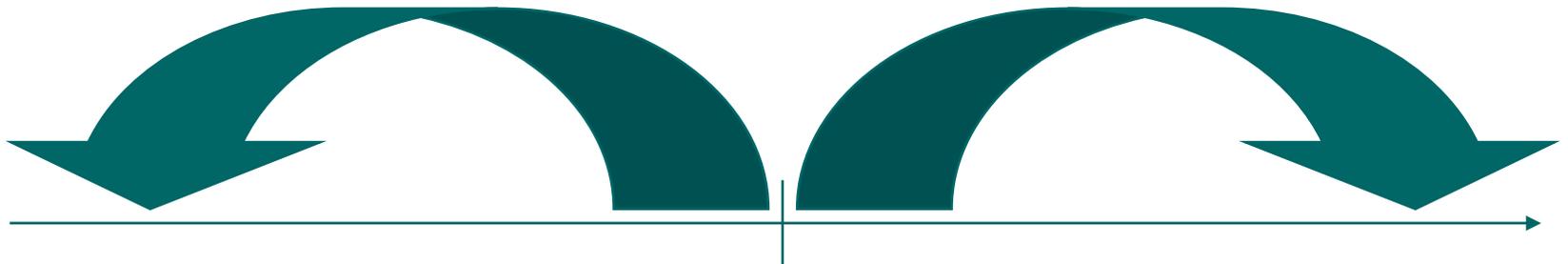
- Objectifs
- Flore recherchée
- Protocole d'analyse
- Analyse des résultats

# OBJECTIFS

---

**VERIFICATION DES  
PROCÉDÉS DE  
FABRICATION**

**VERIFICATION DE  
LOTS**



**Plan de contrôle**

**Plan d'échantillonnage**

# OBJECTIFS

---

## ○ VÉRIFICATION DES PROCÉDÉS

- Critères d'hygiène
- Lors de la fabrication
- Conditions les plus défavorables
- Tient compte des résultats antérieurs si les procédés de fabrication sont maîtrisés (CCP, BPH)

## ○ VERIFICATION DES LOTS

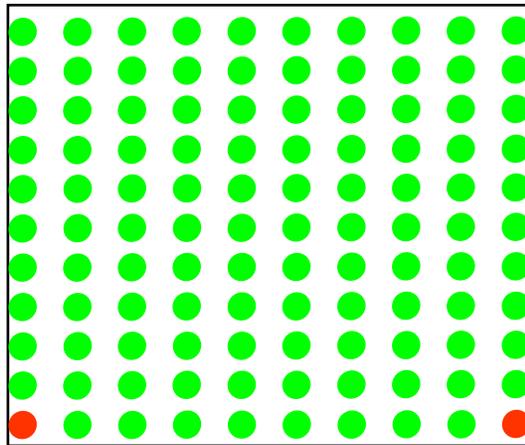
- Critères de sécurité
- Depuis la mise sur le marché jusqu'à la fin de la durée de vie
- Echantillon représentatif du lot
  - Lot homogène
  - Tirage aléatoire
- Lots indépendants

# Limites du plan d'échantillonnage

## Probabilité

---

- Urne avec des boules vertes et rouges
- Probabilité P de tirer 5 boules vertes
- Avec 2% de boules rouges



$$P = 0,9$$

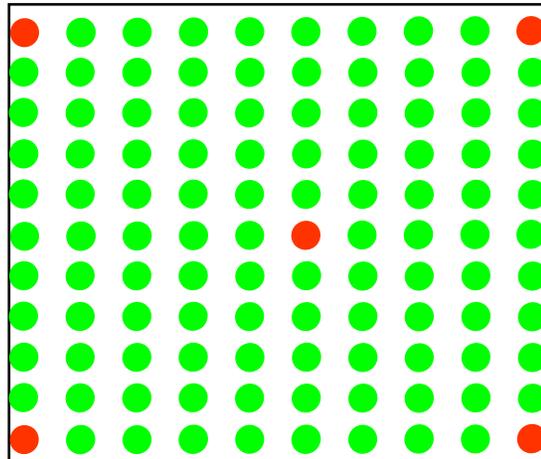
- Signification bactériologique
  - 5 échantillons, tolérance 0 ( $n=5, c=0$ )
  - 90% des cas, acceptation d'un lot malgré 2% de NC

# Limites du plan d'échantillonnage

## Probabilité

---

- Idem avec 5% de boules rouges



$$P = 0,77$$

- Signification bactériologique
  - 5 échantillons, tolérance 0 ( $n=5, c=0$ )
  - 77% des cas, acceptation d'un lot malgré 5% de NC

# Limites du plan d'échantillonnage

---

- 5 échantillons, tolérance 0 ( $n=5, c=0$ )
  - 90% des cas, acceptation lot dont 2 % NC
  - 77% des cas, acceptation lot dont 5 % NC
  - 59% des cas, acceptation lot dont 10 % NC
  - 17% des cas, acceptation lot dont 30 % NC
  - 10% des cas, acceptation lot dont 36 % NC
  - 3 % des cas, acceptation lot dont 50 % NC

# OBJECTIFS

---

- Cas particuliers
  - Plat témoin
    - enquête épidémiologique à la suite de l'apparition d'une TIA (toxi-infection alimentaire)
  - Lait : germes (et cellules)
    - paiement du lait à la qualité
    - élimination de la collecte des laits non conformes
  - Viande fraîche (en complément de l'IPM)
    - Circulaire du 30 juin 1970

# DEMANDEURS

---

- Auto-contrôle bactériologique par les industriels
  - Plan de Maîtrise Sanitaire (PMS) avec HACCP
  - Contrôle de surfaces, de matières premières, en cours de fabrication, produits finis...
- Contrôle par les services officiels
  - Inspections programmées, plans de surveillance, relevés d'infraction...
  - Plats témoins, viande fraîche

# Plan

---

- Indications

- Flore recherchée

- Protocole d'analyse

- Analyse des résultats



# Flore recherchée

---

- Flore pathogène
- Flore témoin de contamination (indicateur)
- Flore totale
- Flore d'altération
- Flore technologique

# Flore recherchée

## Flore pathogène

---

- Responsables de TIA
  - Salmonelles
  - Staphylococcus aureus (entérotoxine)
  - Clostridium perfringens
  - Listeria monocytogenes
  - Escherichia coli (STEC)
  - Campylobacter, yersinia, ...
  
  - Remarque : et les virus ?
  
- Germes zoonosiques
  - ~~Brucella, mycobactéries...~~
  - Bacillus anthracis
  - Erysipelothrix rhusiopathiae...

# Flore recherchée

---

- Flore témoin de contamination
  - Entérobactéries
  - Coliformes totaux
  - Coliformes thermotolérants (« fécaux »)
  - E coli
  - Entérocoques = Streptocoques fécaux
  - Bifidobacterium
    - Spécificité d'espèce hôte (homme)
    - Anaérobie strict
  - Staphylococcus aureus



# Flore recherchée

---

- Flore totale

- Microflore Aérobie Mésophile Totale (MAMT)

- Micro-organismes aérobies 30°C

- Dénombrement sur champ microscopique en contrôle de stérilité

# Flore recherchée

---

## ○ Flore d'altération

- Pseudomonas, Bactéries psychrotrophes
- Brochothrix thermosphacta
- Bacillus
- Levures
- Moisissures...

# Flore recherchée

---

- Flore technologique
  - Nature des germes (Yaourt)
  - Dénombrement en divers produits de fermentation
    - Lactobacilles
    - Microcoques...

# Critères réglementaires

---

- Paquet hygiène
  - **Règlement 2073/2005 du 15/11/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires**

# Critères réglementaires (2073/2005)

---

**Flore totale**

**Entérobactéries**

**E. coli**

**Staphylocoques  
coagulase +**

**Listeria  
monocytogenes**

**Enterobacter  
sakazakii**

**E.Coli STEC**

**Toxine  
staphylococcique**

**Histamine**

**Salmonelles**

**Critères d'hygiène**

**Critères de sécurité**

QSA 2007-2008

Recherche si critères  
d'hygiène défavorables

# Critères réglementaires

---

- Absence de critère réglementaire  
≠ absence de danger
- Pas de critère microbiologique réglementaire si
  - Traitement thermique assainissant
  - Prévalence basse



QSA 2007-2008



# Plan

---

- Indications
- Flore recherchée
- **Protocole d'analyse**
- Analyse des résultats

# Protocole d'analyse

---

- Méthodes traditionnelles (lentes)
  - Normes NF, EN, ISO
- Méthodes rapides immunologiques et/ou génétiques
  - Normalisées ou non
  - Qualitatives ou semi quantitatives
- Accréditation COFRAC du laboratoire

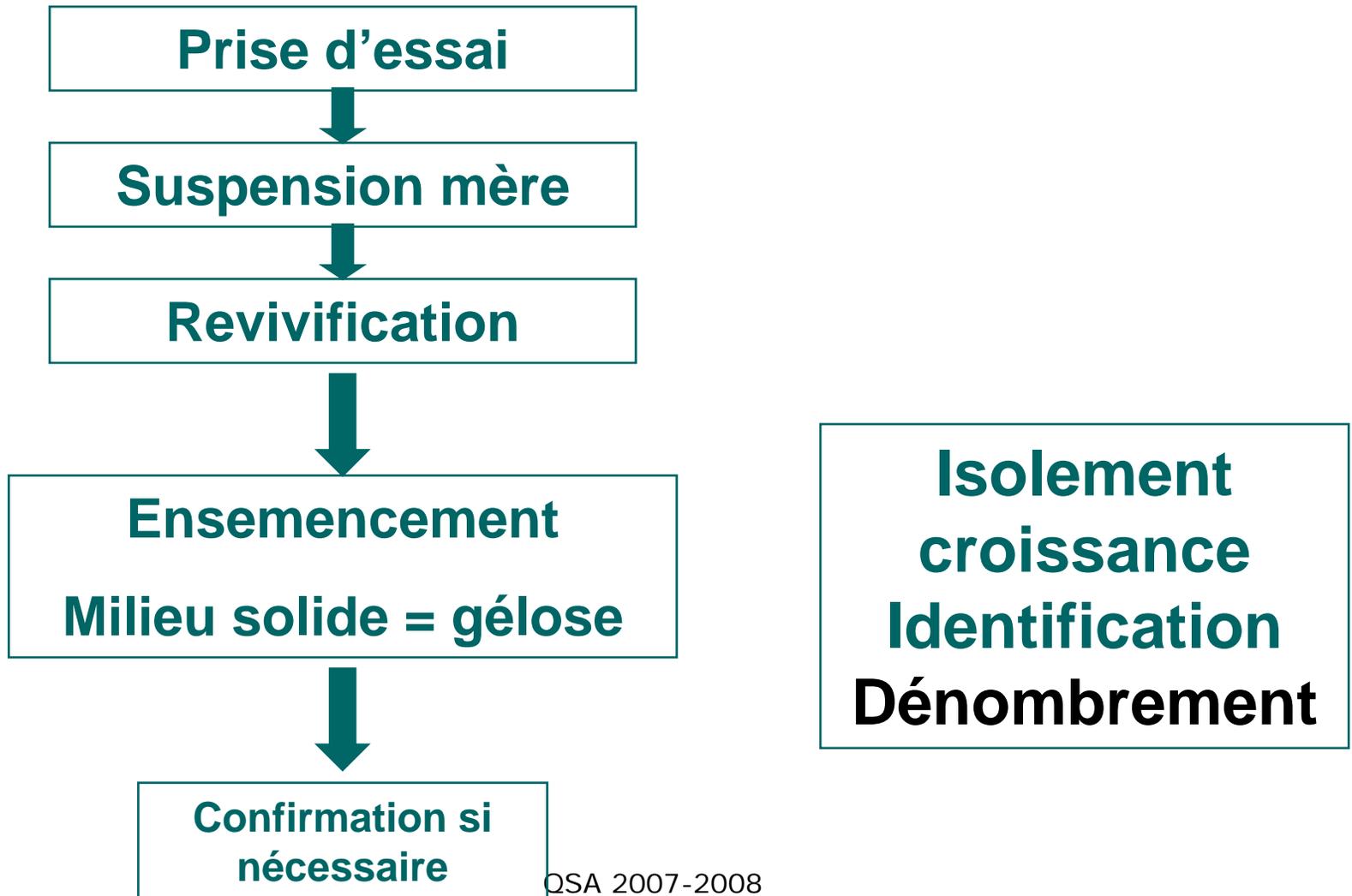
# Méthodes traditionnelles

---

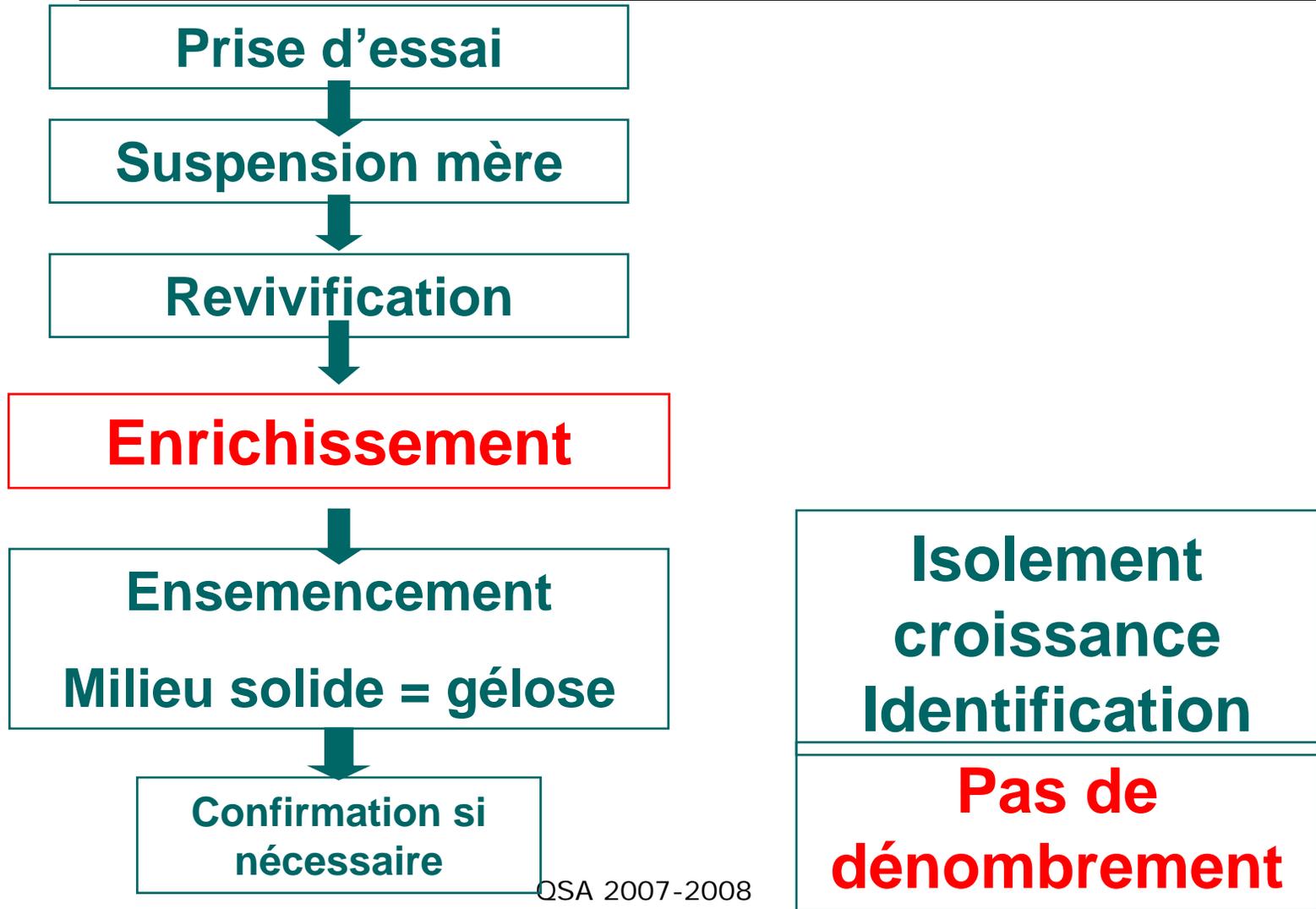
- Conditions générales
  - Modalités classiques d'analyse bactériologique (Stérilité)

# Schéma général

---



# Variante avec enrichissement



# Echantillon – Prise d'essai

---

- Nombre

- Soit défini réglementairement
  - 5 échantillons de 100g par ex
- Soit selon plan d'échantillonnage

- Nature

- Surface, Profondeur, Produit entier
- Conditions les plus défavorables ou prélèvement aléatoire

# Prise d'essai - Broyage

---

- Suspension mère

- 10g + 90 ml

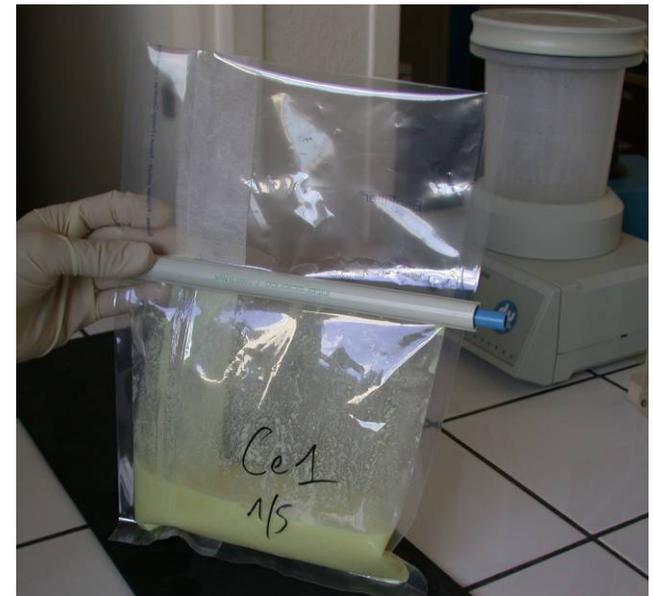
- 25g + 225 ml

} Dilution au 1/10

- Broyage & homogénéisation

- Bol mixer

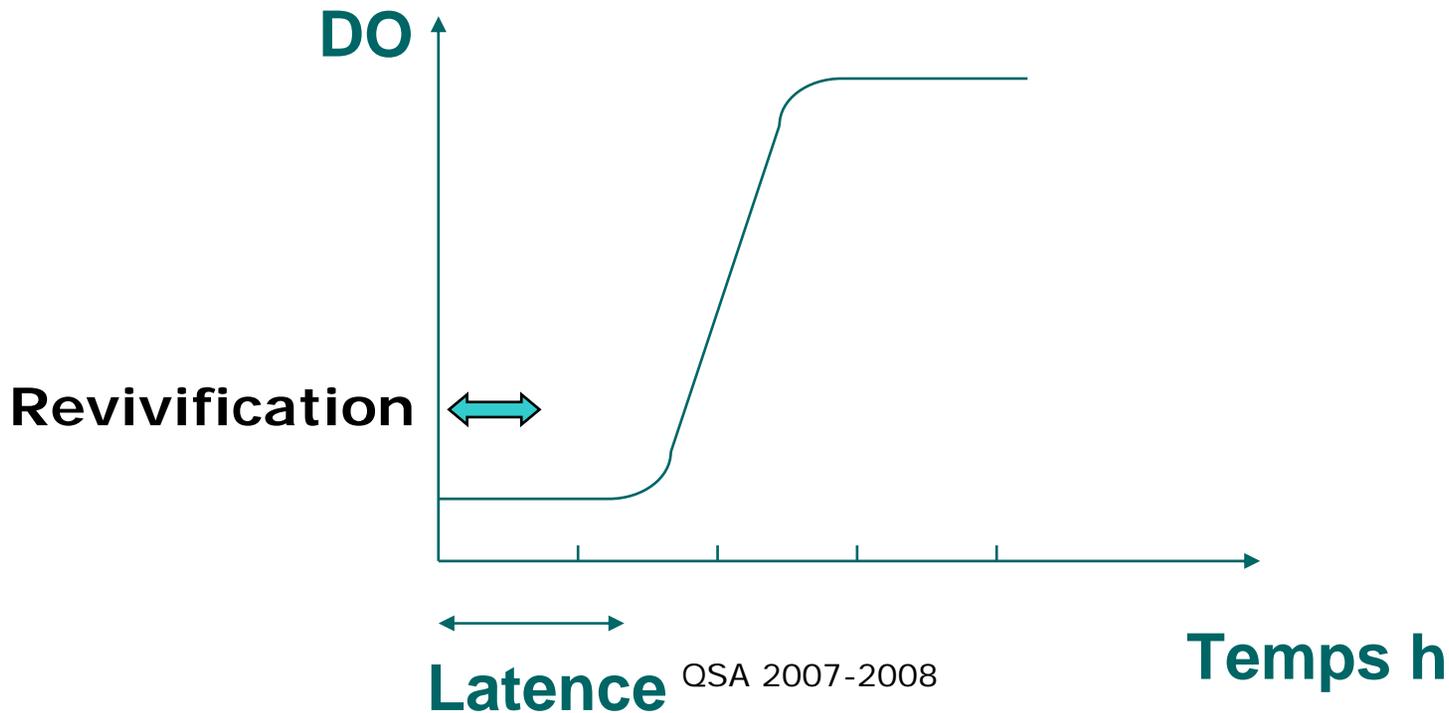
- Sac stomacher



# Revivification

---

- Environ 45' à température ambiante
  - Récupération du stress
  - Phase de latence



# Milieux de croissance liquide ou solide

---

- Nutriments
  - Extrait de protéines, Extrait de levures
  - Glucides...
- Inhibiteur / activateur sélectif
  - Vert brillant: inhibe gram +
  - Antibiotiques
  - Sels biliaires
  - Nacl...
- Indicateurs colorés
  - rouge neutre
  - Bleu de bromothymol...

**Milieu sélectif ou  
électif**

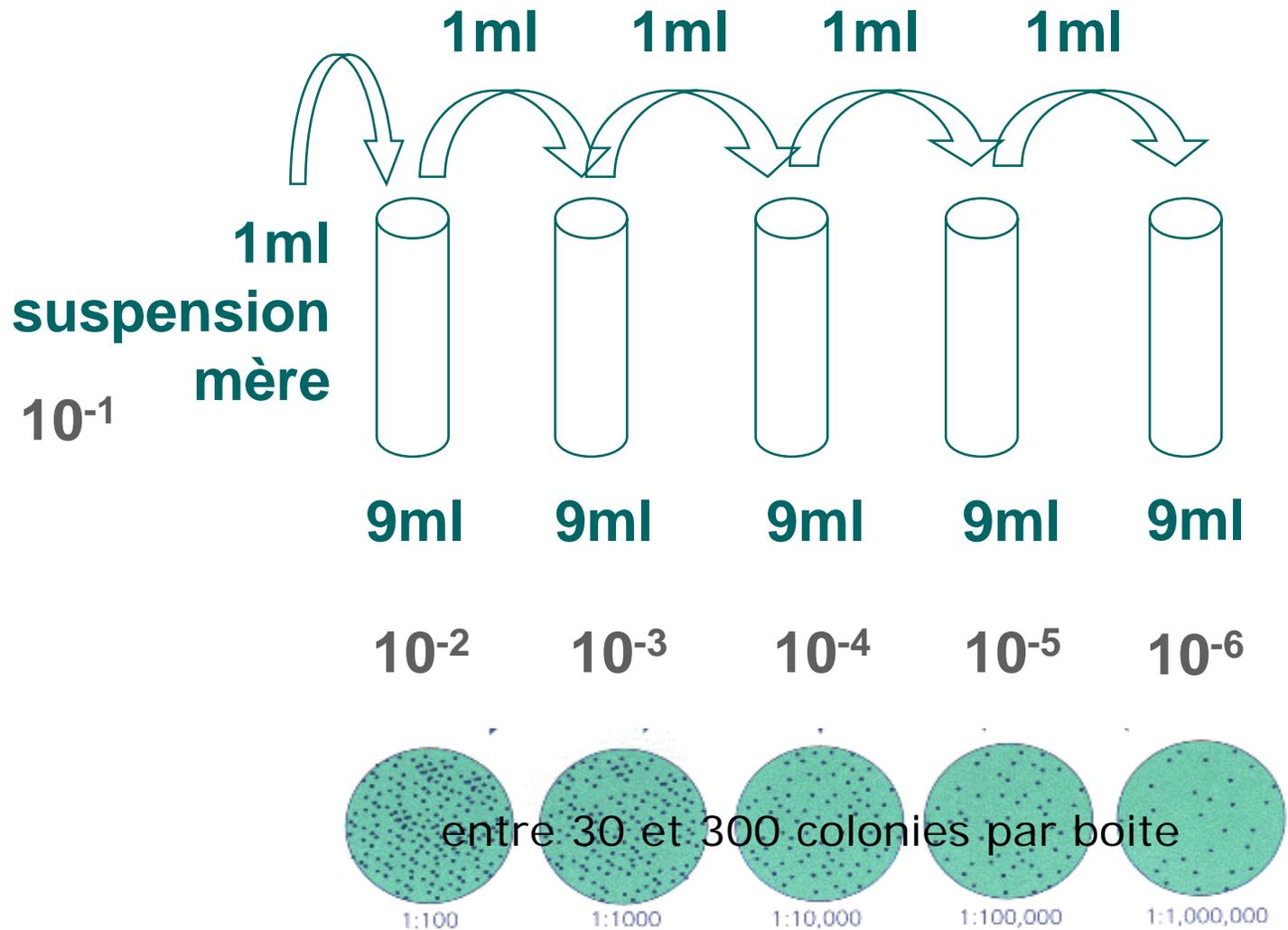
**Mise en évidence  
d'une variation de pH  
par fermentation**

# Croissance

---

- A une température définie
- Dénombrement en milieu solide
  - dilution
  - ensemencement d'une gélose spécifique
    - dénombrement de colonies isolées
- Recherche après enrichissement
  - Enrichissement en eau peptonée + facteurs de croissance
  - ensemencement d'une gélose spécifique
    - identification des colonies isolées

# Dilution



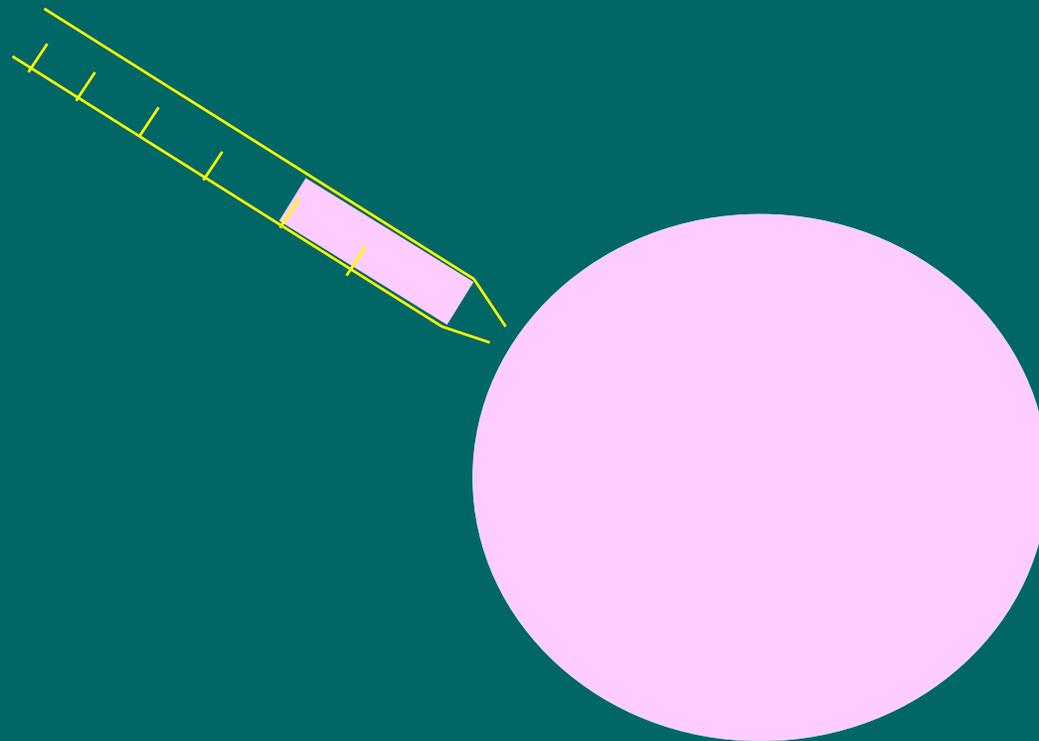
# Ensemencement

---

- En nappe (surface) ou dans la masse
  - Volume dosé
    - 1ml ou 0,1ml
  - → Isolement, dénombrement, parfois identification

# Ensemencement En nappe ou dans la masse

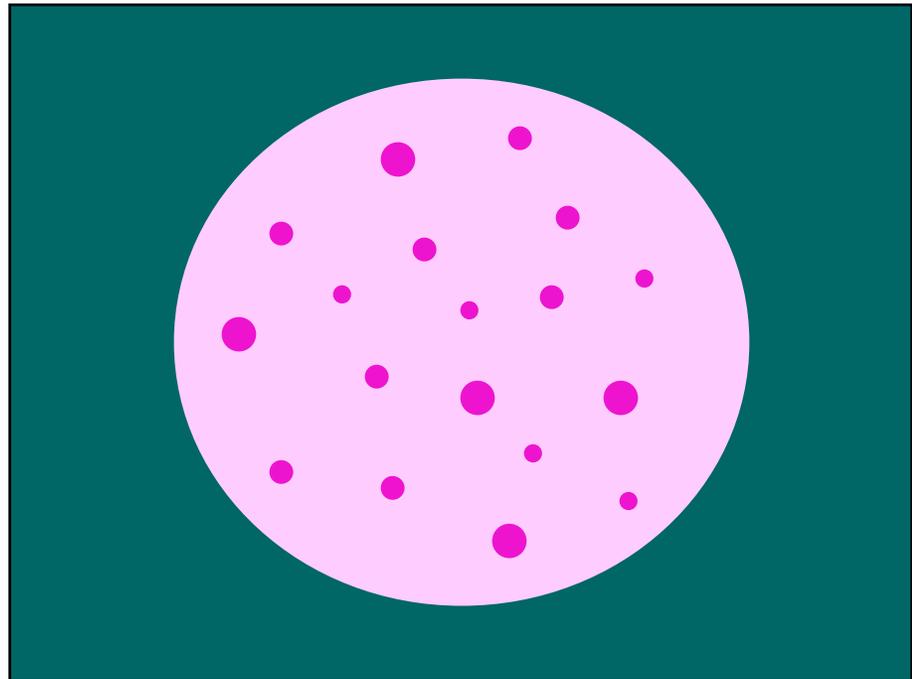
---



# Après Croissance Dénombrement

---

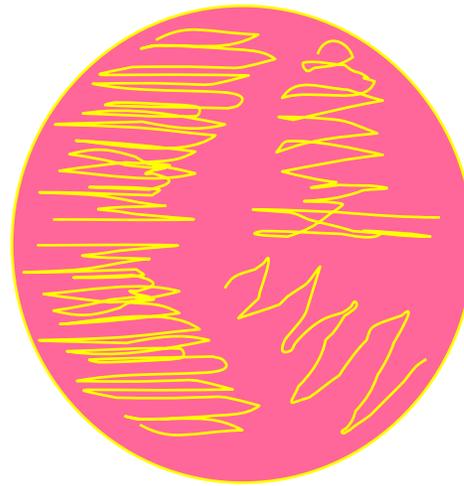
- 24 à 48h à une température donnée
- Colonies → UFC



# Ensemencement

---

- Par épuisement
  - Après enrichissement
  - → isolement et identification



# Après Croissance Identification

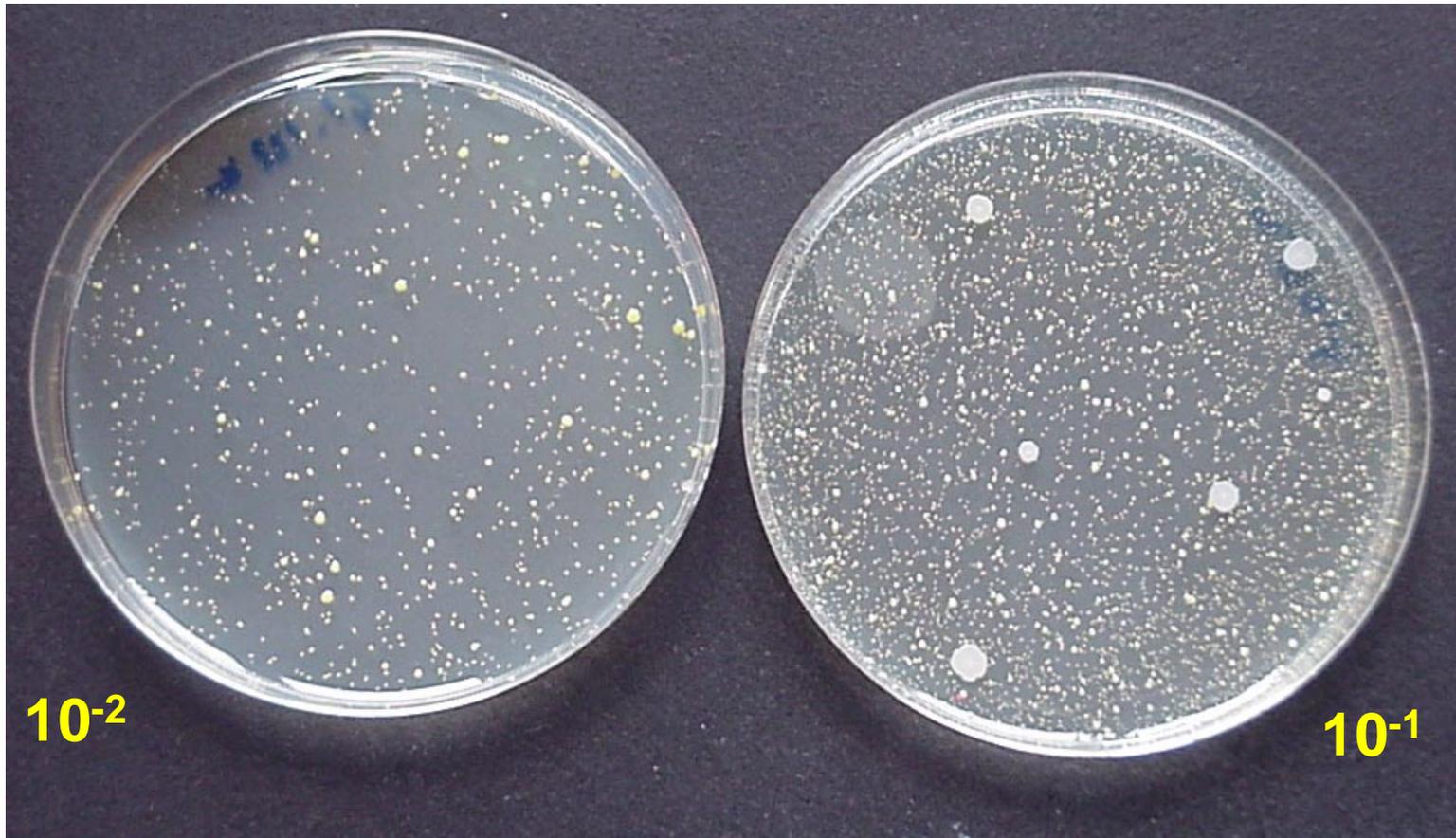
---

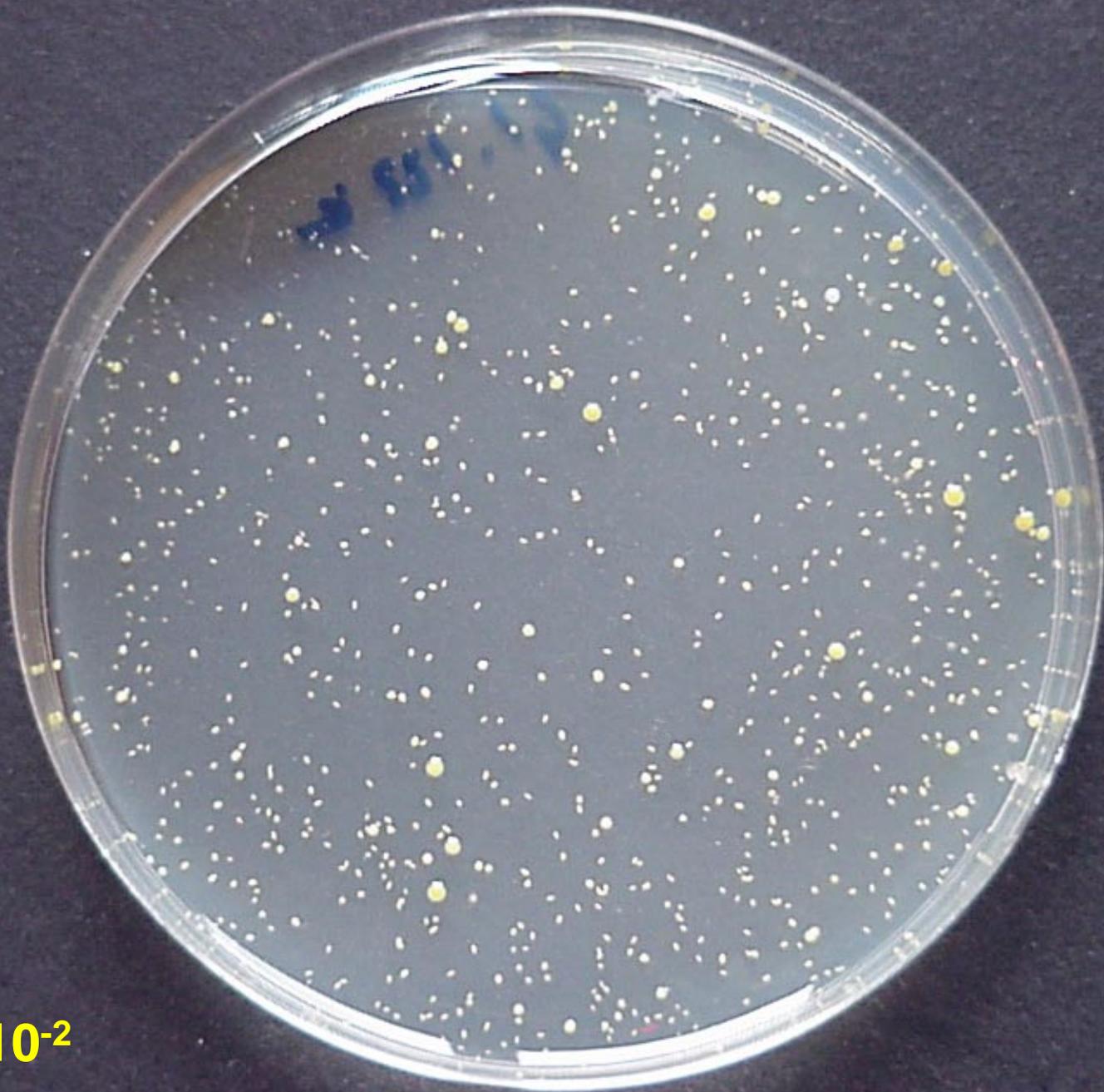
- Modification du milieu de croissance
  - Production de gaz en milieu liquide
  - Acidification
    - Substrat
    - Indicateur coloré
  - Production d'H<sub>2</sub>S...
- Suffisant pour certains critères
- Confirmation par test pour d'autres

# MAMT

---

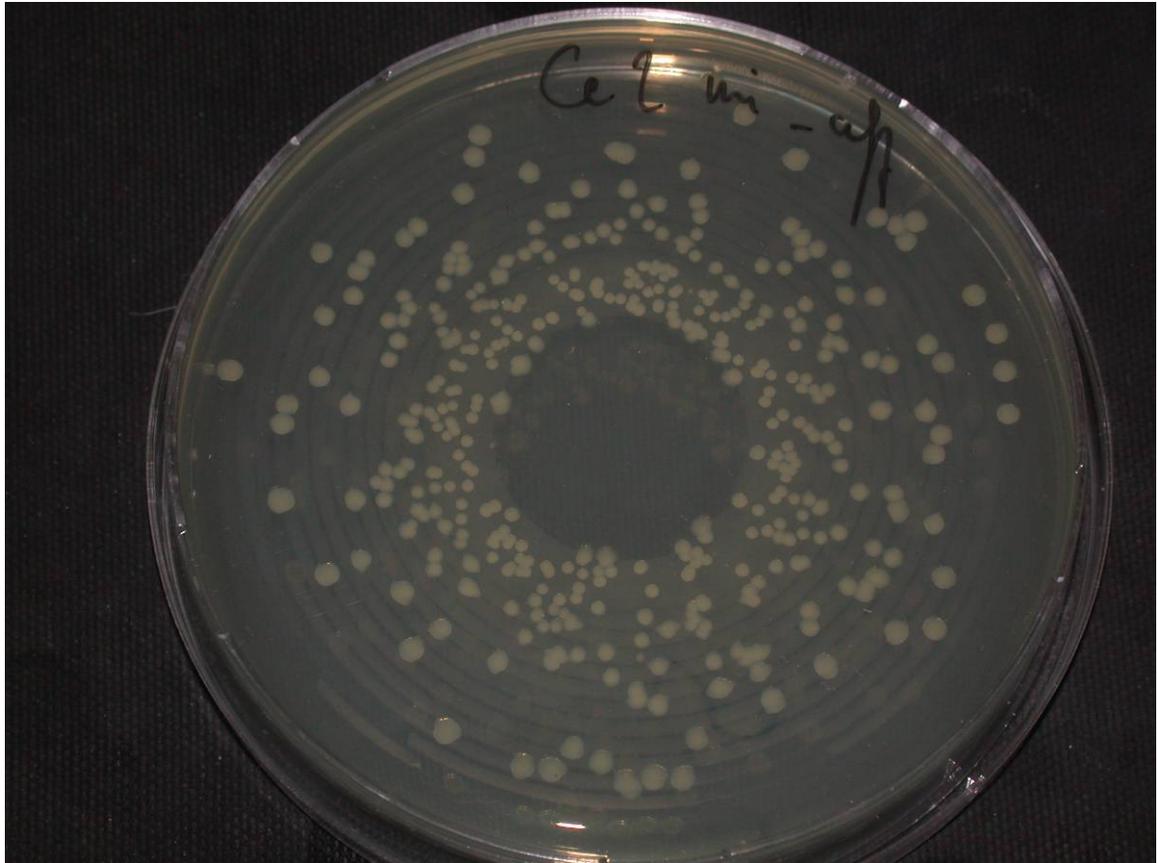
- Gélose PCA





$10^{-2}$

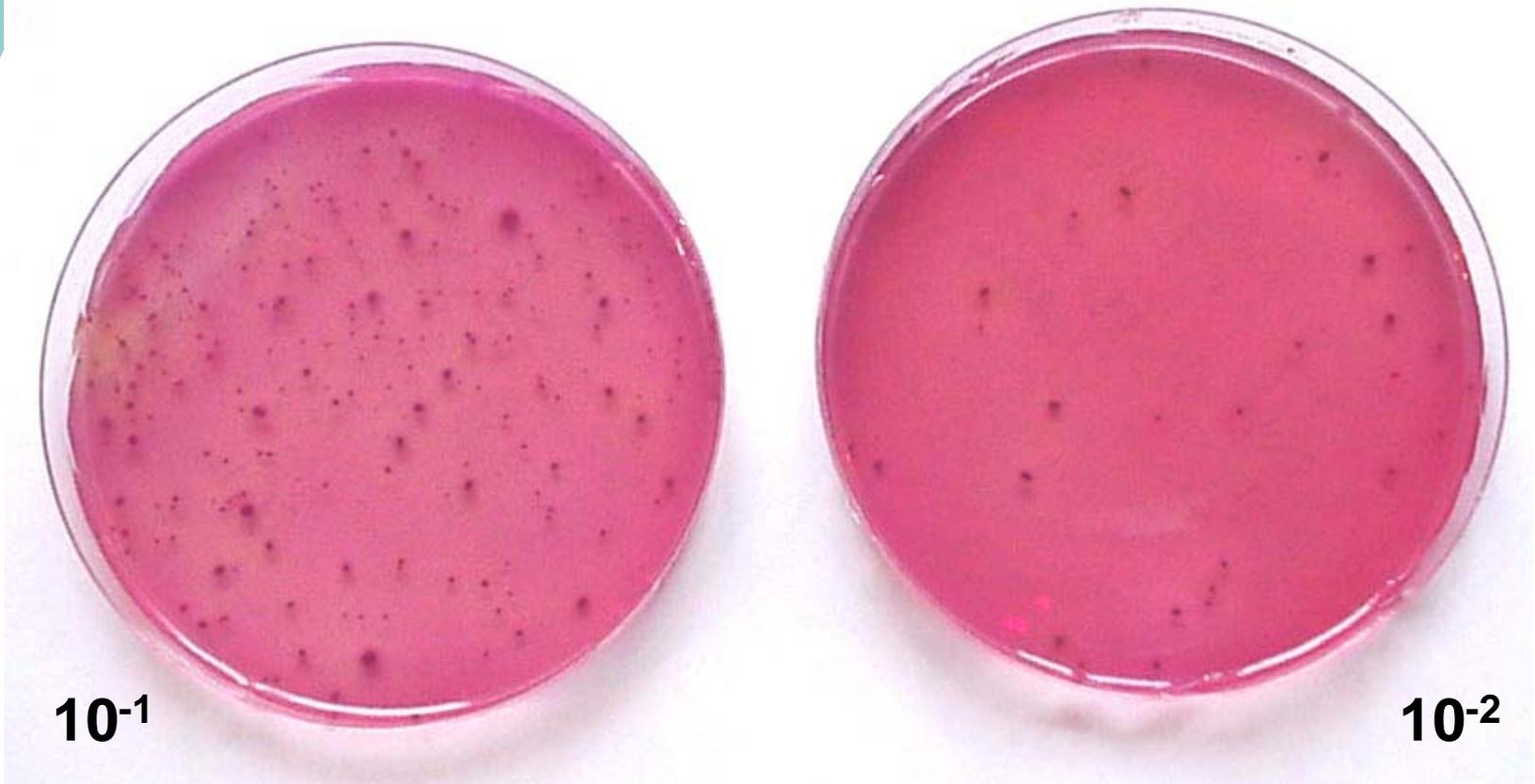
# Ensemenceur spiral



# Coliformes

---

- Gélose Désoxycholate lactose



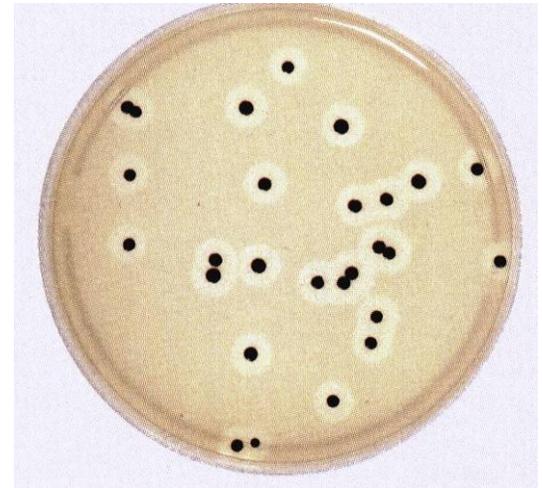


**10<sup>-1</sup>**

# Staphylocoque aureus

---

- Gélose Baird Parker au fibrinogène et plasma de lapin
  - Tellurite de potassium--> Réducteur
  - Plasma de lapin et fibrinogène--> coagulase +



**Staphylocoques  
coagulase +**

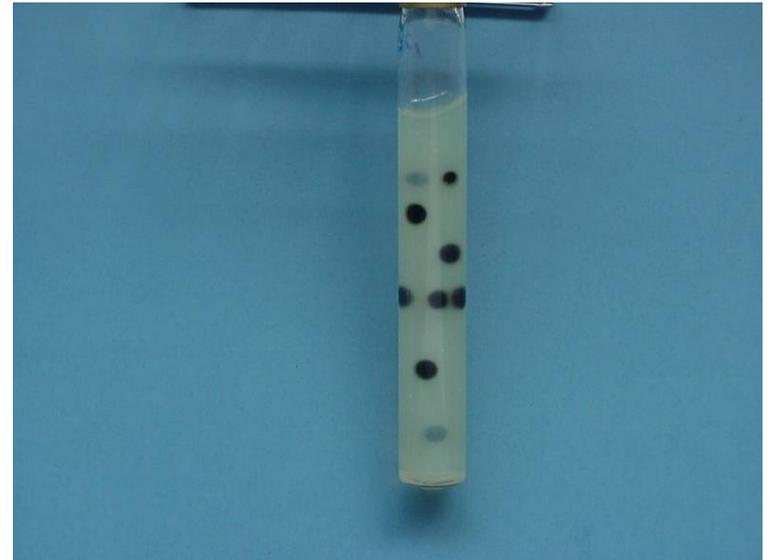


# ASR (*Clostridium perfringens*)

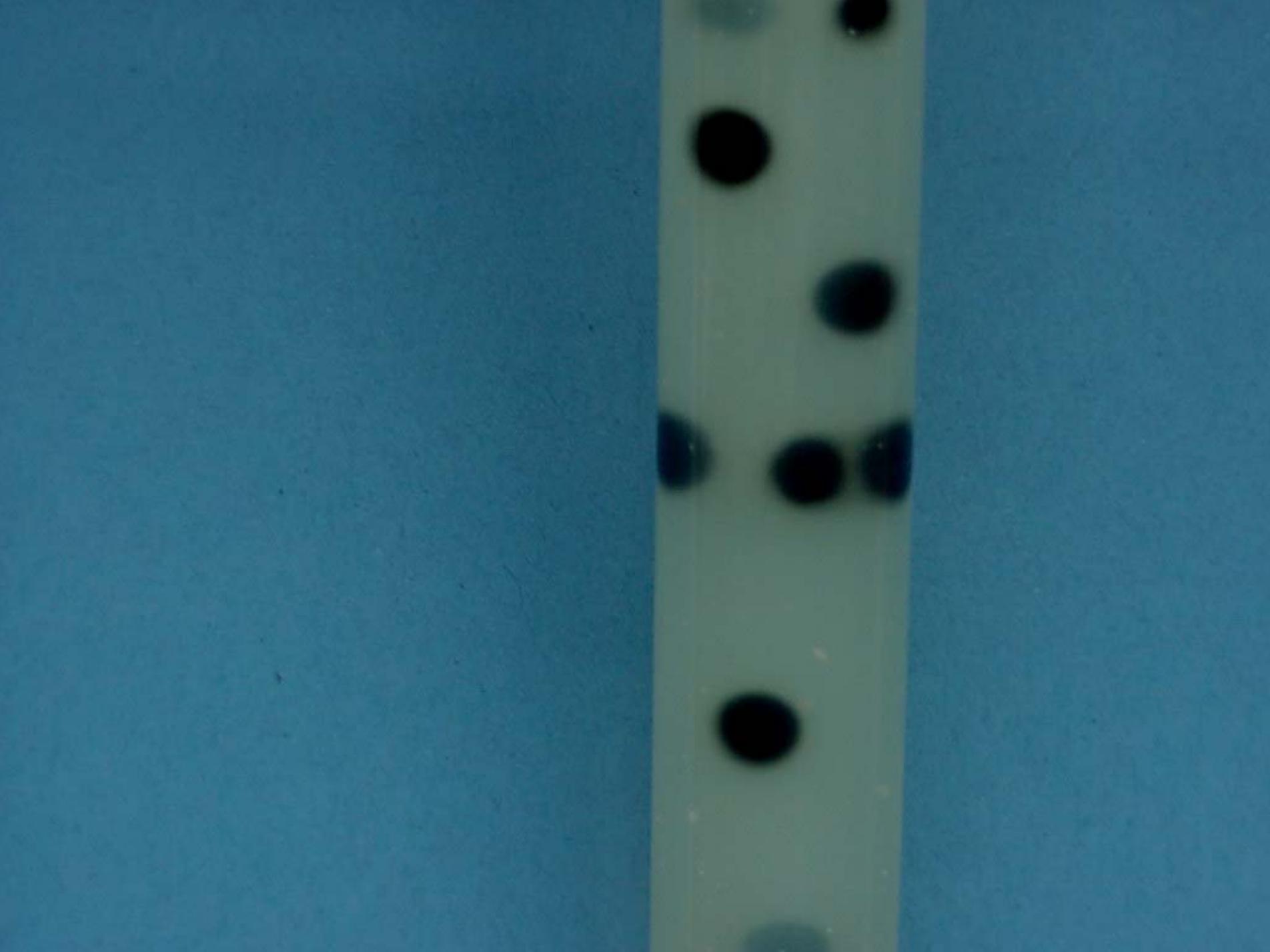
---

## ○ Gélose TSN

- Trypticase, sulfite, néomycine
- Régénération avec ébullition--> anaérobiose



**Anaérobies  
sulfitoréducteurs**



# Salmonelles

---

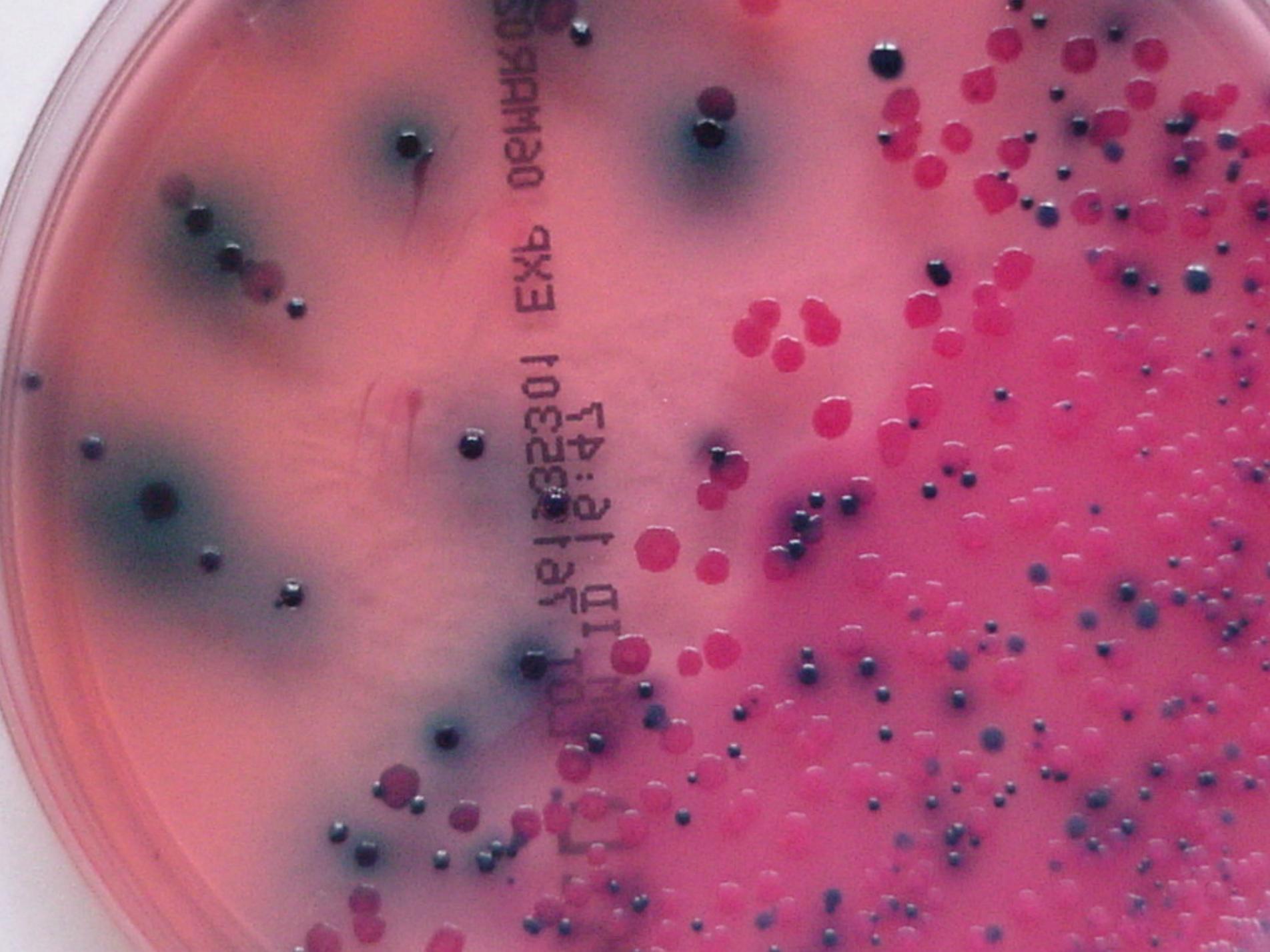
- Gélose SM ID
  - Vert brillant, Sels biliaires, 2 substrats chromogènes
  - Indicateur coloré : Rouge neutre



**Absence de colonies roses**  
**Absence de Salmonelles**



**colonies roses**  
**Suspicion de Salmonelles**



74:2101  
103281a7  
9X3  
SOYAMAO

# Salmonelles

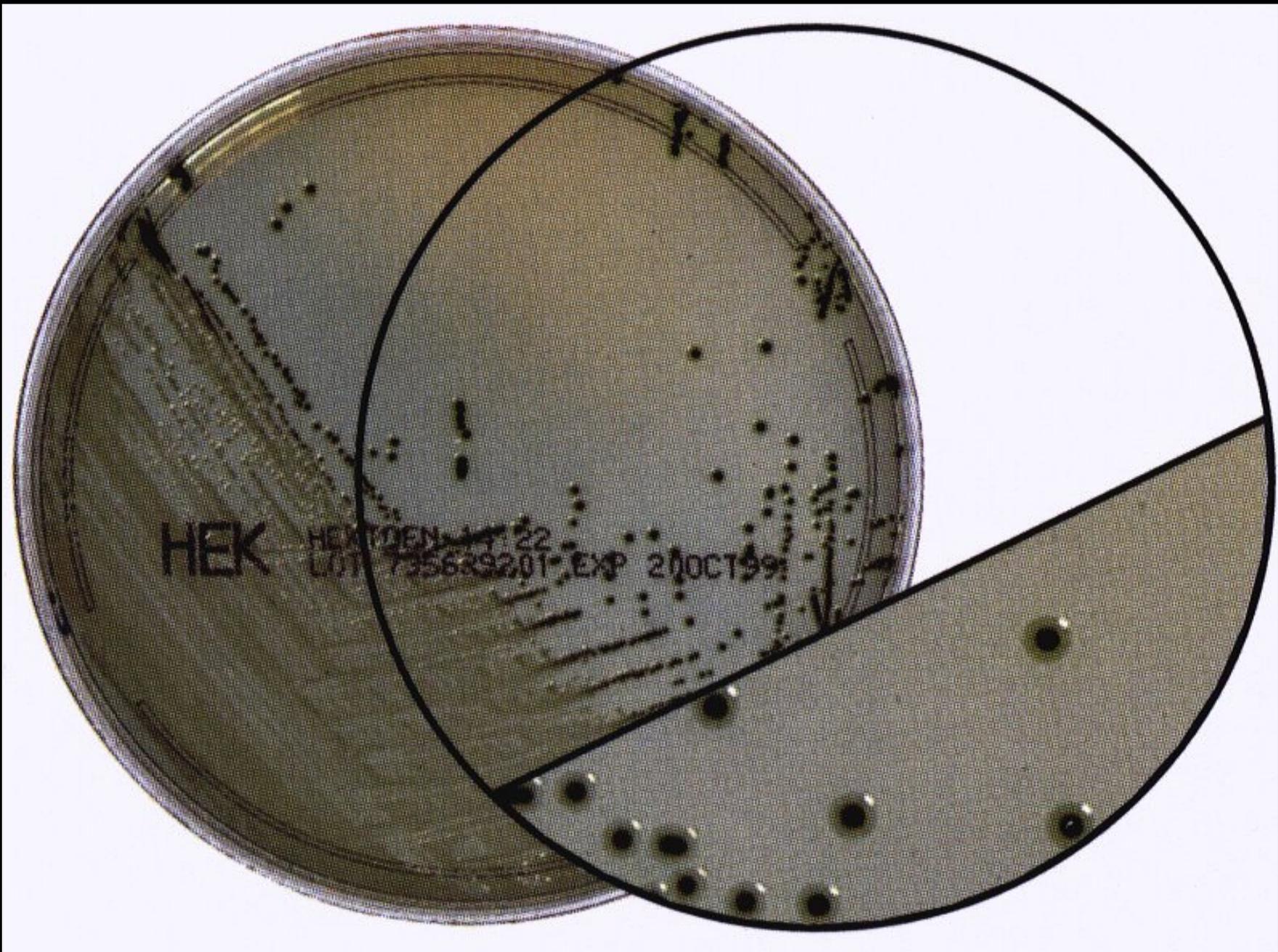
---

- Gélose Hektoen
  - Lactose
  - Bleu de bromothymol
  - Hyposulfite de sodium + Citrate de Fer

**Colonies à centre noir**

**Suspicion de  
Salmonelles**



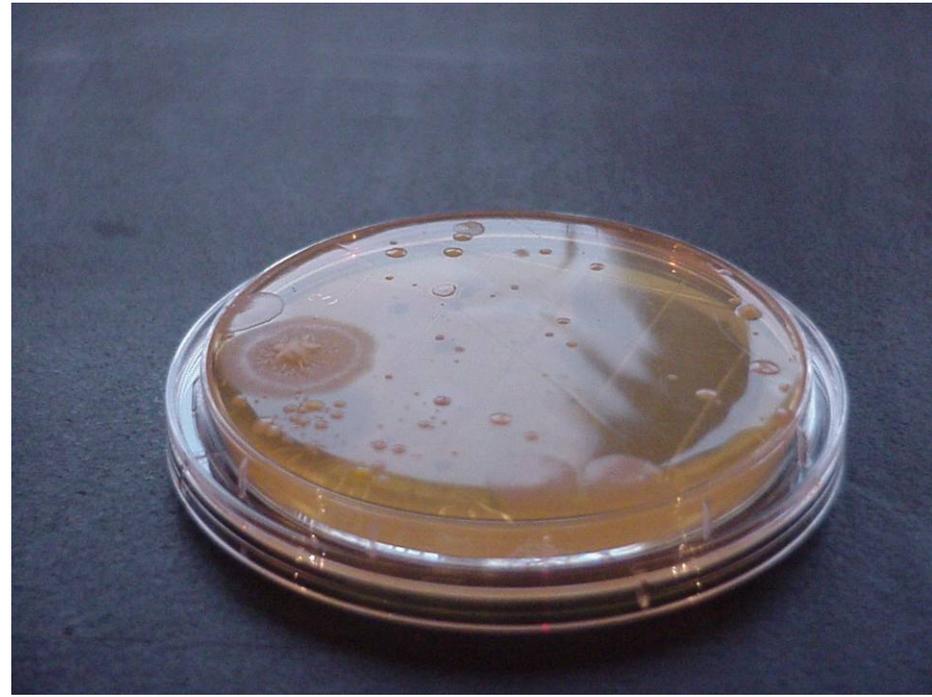
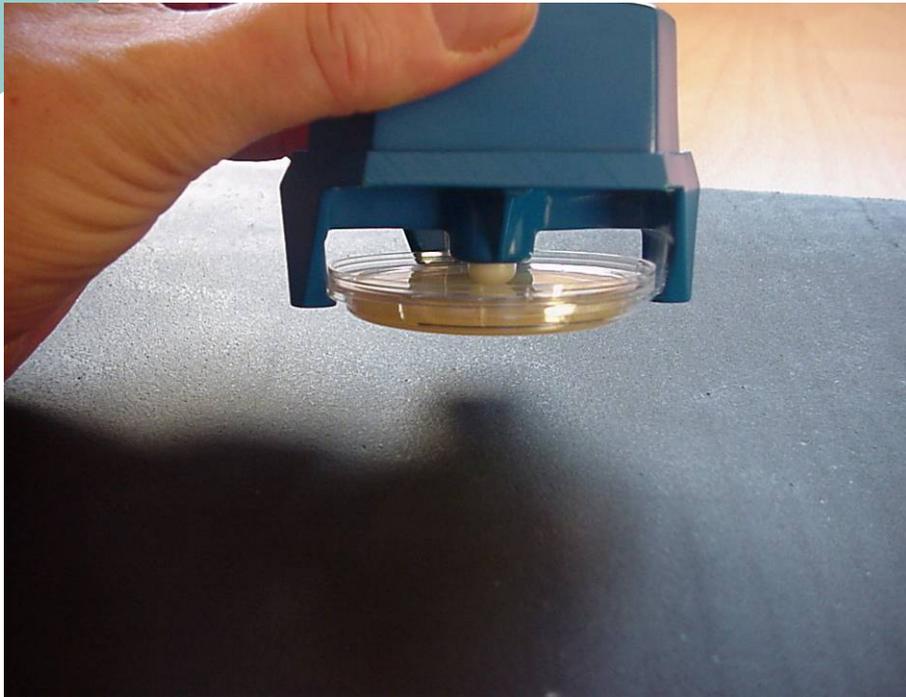


HEK

HEKIDEN-11-22  
LOT 735639201 EXP 21OCT99

# Contrôle de surfaces

---

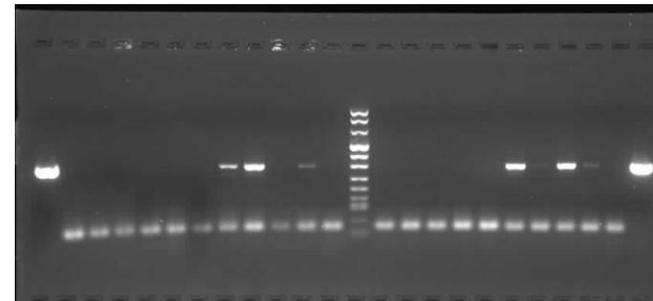


# Confirmation

- Biochimique
  - Galerie Api

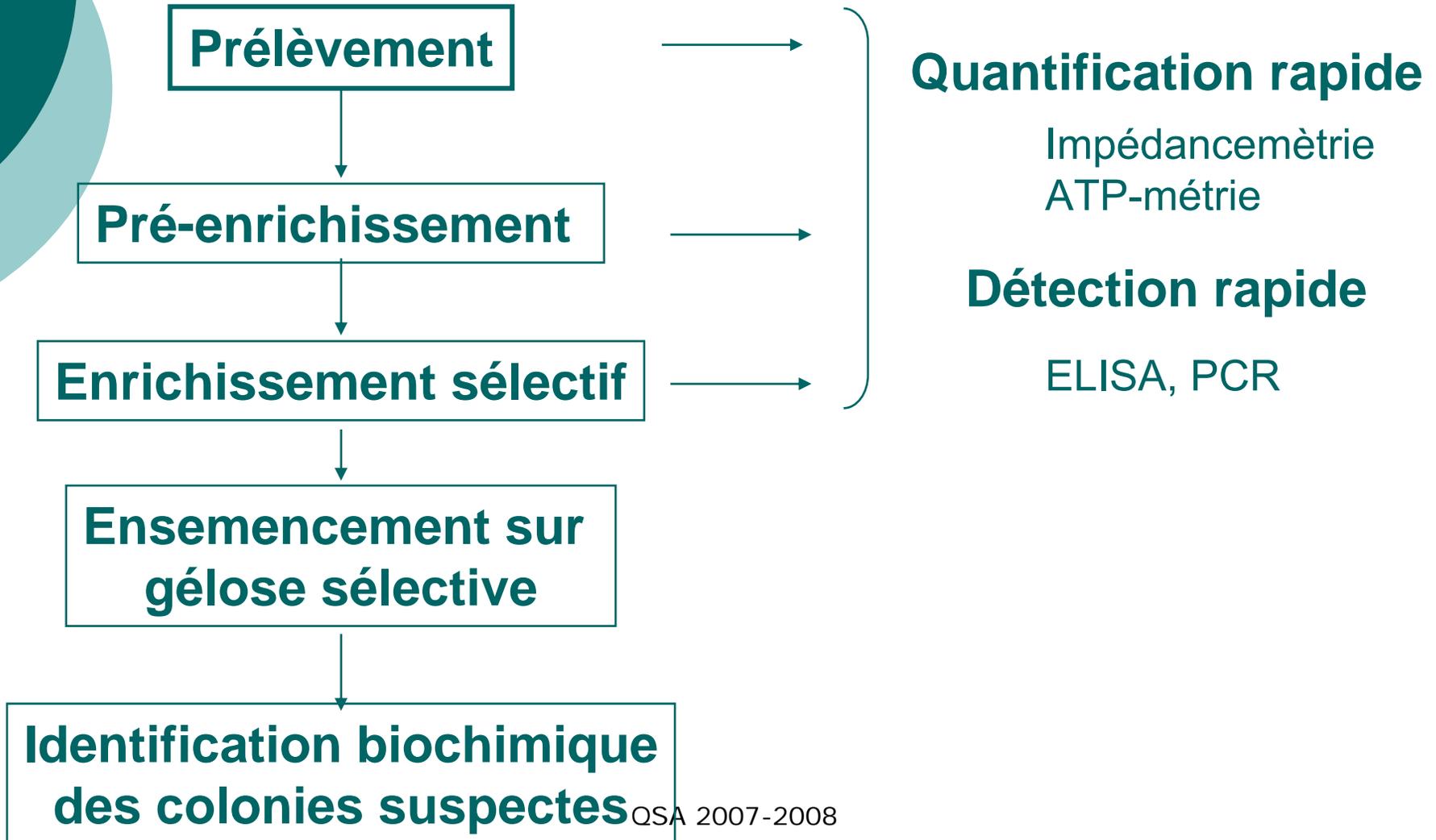


- Sérotypique
  - Ag capsulaire (K) somatique (O) ou flagellaire (H)
- Lysotypique
- Génotypique
  - Biologie moléculaire



# Méthodes rapides

---



# Méthodes rapides de détection

---

- Avantages

- gain de temps
- facilité d'utilisation, simplicité
- performance

- Inconvénients

- matériel particulier, coût
- confirmation par méthode de référence sauf si validation officielle (AFNOR, ISO)



# Plan

---

- Indications
- Flore recherchée
- Protocole d'analyse
- Analyse des résultats



# Analyse des résultats

---

- Critères microbiologiques
- Plan à 2 classes
- Plan à 3 classes



# Critère microbiologique

---

- Produit
- Micro-organisme
- Stade d'application
- Plan d'échantillonnage
- Méthodes d'analyse
- Limites
- Conduite à tenir

# Critères microbiologiques

---

- Définis réglementairement
  - Règlement 2073/2005
  - ~~AM du 21 décembre 1979 (abrogé)~~
- Définis par l'industriel à la suite de l'analyse des dangers (Plan HACCP)

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes/ toxines, métabolites	Plans d'échantillonnage <sup>(1)</sup>		Limites <sup>(2)</sup>		Méthode d'analyse de référence <sup>(3)</sup>	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
1.1 Denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées aux nourrissons et denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées à des fins médicales spéciales <sup>(4)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 11290-1	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.2 Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g <sup>(5)</sup>		EN/ISO 11290-2 <sup>(6)</sup>	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
		5	0	Absence dans 25 g <sup>(7)</sup>		EN/ISO 11290-1	Avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriquée.
1.3 Denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales <sup>(4)</sup> <sup>(8)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 <sup>(6)</sup>	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.4 Viande hachée et préparations de viande destinées à être consommées crues	<i>Salmonella</i>	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 viande de volailles destinées à être consommées cuites	<i>Salmonella</i>	5	0	À partir du 1.1.2006 Absence dans 10 g À partir du 1.1.2010 Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.6 Viande hachée et préparations de viande d'autres espèces que les volailles destinées à être consommées cuites	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.7 Viandes séparées mécaniquement <sup>(9)</sup>	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.8 Produits à base de viande destinés à être consommés crus, excepté les produits dont le procédé de fabrication ou la composition permettent de supprimer le risque salmonelles	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes/ toxines, métabolites	Plans d'échantillonnage <sup>(1)</sup>		Limites <sup>(2)</sup>		Méthode d'analyse de référence <sup>(3)</sup>	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
1.18 Graines germées (prêtes à être consommées) <sup>(12)</sup>	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.19 Fruits et légumes prédécoupés (prêts à être consommés)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.20 Jus de fruits et de légumes non pasteurisés (prêts à être consommés)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.21 Fromages, lait en poudre et lactosérum en poudre, visés dans les critères staphylocoques à coagulase positive au chapitre 2.2 de la présente annexe	Entérotoxines staphylococciques	5	0	Pas de détection dans 25 g		Méthode européenne de dépistage du LCR pour le lait <sup>(13)</sup>	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.22 Préparations en poudre pour nourrissons et aliments diététiques en poudre destinés à des fins médicales spéciales pour nourrissons de moins de six mois, visées dans le critère applicable aux entérobactériacés au chapitre 2.2 de la présente annexe	<i>Salmonella</i>	30	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.23 Préparations en poudre pour nourrissons et aliments diététiques en poudre destinés à des fins médicales spéciales pour nourrissons de moins de six mois, visées dans le critère applicable aux entérobactériacés au chapitre 2.2 de la présente annexe	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	Absence dans 10 g		ISO/DTS 22964	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.24 Mollusques bivalves vivants et échinodermes, tuniciers et gastéropodes vivants	<i>E. coli</i> <sup>(14)</sup>	1 <sup>(15)</sup>	0	230 NPP/100 g de chair et de liquide intravalvaire		ISO TS 16649-3	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.25 Produits de la pêche fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine <sup>(16)</sup>	Histamine	9 <sup>(17)</sup>	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC <sup>(18)</sup>	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

## Chapitre 2. Critères d'hygiène des procédés

### 2.1 Viandes et produits à base de viandes

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage <sup>(1)</sup>		Limites <sup>(2)</sup>		Méthode d'analyse de référence <sup>(3)</sup>	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.1.1 Carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés <sup>(4)</sup>	Nombre de colonies aérobies			3,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	5,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	ISO 4833	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
	Enterobacteriaceae			1,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	2,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	ISO 21528-2	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
2.1.2 Carcasses de porcins <sup>(4)</sup>	Nombre de colonies aérobies			4,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	5,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	ISO 4833	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
	Enterobacteriaceae			2,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	3,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log moyen quotidien	ISO 21528-2	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
2.1.3 Carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés	<i>Salmonella</i>	50 <sup>(5)</sup>	2 <sup>(6)</sup>	Absence dans la partie examinée de la carcasse		EN/ISO 6579	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé et de l'origine des animaux
2.1.4 Carcasses de porcins	<i>Salmonella</i>	50 <sup>(5)</sup>	5 <sup>(6)</sup>	Absence dans la partie examinée de la carcasse		EN/ISO 6579	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé, de l'origine des animaux et des mesures de biosécurité dans les exploitations d'origine
2.1.5 Carcasses de volailles: poulets et dindes	<i>Salmonella</i>	50 <sup>(5)</sup>	7 <sup>(6)</sup>	Absence dans 25 g d'un échantillon groupé de peau du cou		EN/ISO 6579	Carcasses après le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé, de l'origine des animaux et des mesures de biosécurité dans les exploitations d'origine

# Plan à 2 classes

---

- Présence ou absence
- Certains critères quantitatifs
  - pas de valeur de M (exemple listeria)

**m**

**Satisfaisant**

**Non satisfaisant**

# Plan à 3 classes

---

- Critère quantitatif
  - Exemple:  $n=5$ ,  $c=2$

$m$

$M = 10m$  généralement

**Satisfaisant**

**Acceptable si  
1 ou 2  
échantillons sur 5  
3 échantillons  
ou plus sur 5**

**Non  
satisfaisant**

# Analyse des résultats

---

- Prise en compte de tous les critères
- Résultats insatisfaisants
  - Réflexions sur l'origine de la défaillance
  - Mesures correctives
- Critère de sécurité
  - Mesures de retrait ou de rappel du lot

# Exemple : lait en poudre

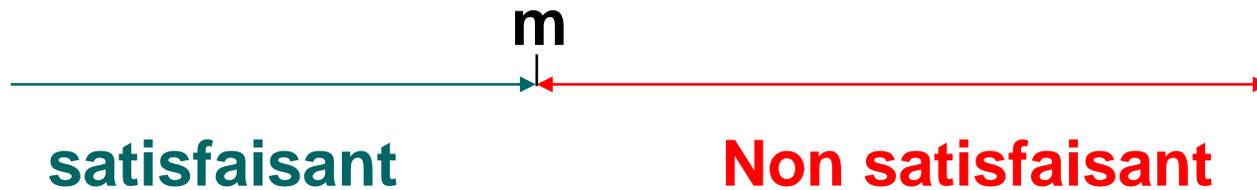
## Critères d'hygiène des procédés

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage <sup>(1)</sup>		Limites <sup>(2)</sup>		Méthode d'analyse de référence <sup>(3)</sup>	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.2.7 Lait en poudre et lactosérum en poudre <sup>(4)</sup>	Entero-bacteriaceae	5	0	10 ufc/g		ISO 21528- 1	Fin du procédé de fabrication	Contrôle de l'efficacité du traitement thermique et prévention de la recontamination
	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	EN/ISO 6888-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production. Lorsque des valeurs > 10 <sup>5</sup> ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques.

# Exemple : lait en poudre

Entérobactéries,  $n=5$ ,  $c=0$ ,

Limites  $m = 10$  ufc/g



<10	<10	10	10	10	Satisfaisant
10	10	10	200	10	Non Satisfaisant
10	100	10	100	30	Non Satisfaisant
10	10	20	100	30	Non Satisfaisant
10	10	10	10	10	Satisfaisant

# Exemple : lait en poudre

Staphylocoques coagulase +, n=5 c=2,

Limites m = 10 ufc/g, M = 100 ufc/g



<10	<10	<10	<10	<10	<b>Satisfaisant</b>
<10	<10	<10	<b>200</b>	<10	<b>Non satisfaisant</b>
<10	<10	<10	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>Acceptable</b>
<10	<10	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>30</b>	<b>Non satisfaisant</b>
<10	<b>400</b>	<10	<b>200</b>	<b>50</b>	<b>Non satisfaisant</b>