

résultats

$m=10g$

0.0001245

21.5%

sampling

5

Proba

25 g

N

N

5g

$n=5, c=0$



Contamination microbienne
des **préparations lactées**
en poudres destinées
aux nourrissons et personnes âgées

*Microbiological contamination
of powdered formulae
for infants
and the elderly*



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

**Contamination microbienne des préparations lactées
en poudres destinées aux nourrissons et personnes âgées**

*Microbiological contamination of powdered formulae
for infants and the elderly*

■ **Coordination rédactionnelle / *Editorial coordination***

Olivier CERF
Pierre COLIN
Jean-Baptiste DENIS
Renaud LAILLER
Valérie LIVRELLI

Composition du groupe de travail *Composition of the working group*

■ **Président**

M. Olivier CERF

Professeur émérite, École nationale vétérinaire d'Alfort

■ **Membres du groupe de travail (coordination)**

Mme Anne BRISABOIS

Afssa - Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires (Lerqap), Maisons-Alfort

M. Pierre COLIN

Afssa - Laboratoire d'études et de recherches avicoles, porcines et piscicoles (Lerpp), Ploufragan - Brest (Section A)

M. Jean-Baptiste DENIS

Institut national de la recherche agronomique (Inra), Jouy-en Josas (Section C)

M. Michel FEDERIGHI

École nationale vétérinaire de Nantes

Mme Véronique LAFARGE

Afssa - Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires (Lerqap), Maisons-Alfort

M. Alexandre LECLERCQ

Institut Pasteur, Paris - vice-président

Mme Valérie LIVRELLI

Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand (Section B)

M. Bertrand LOMBARD

Afssa - Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires (Lerqap), Maisons-Alfort

M. Jean-Philippe ROSEC

Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF), Montpellier

Mme Véronique VAILLANT

Institut de veille sanitaire (InVS), Saint-Maurice

M. Jean-Pierre VINCENT

Institut Pasteur de Lille, Service de microbiologie et d'hygiène alimentaire (SERMHA), Villeneuve-d'Ascq

■ **Agence française de sécurité sanitaire des aliments**

Mme Hélène AUBRY-DAMON

Mme Coralie BULTEL

Mme Anne JONQUIÈRES

M. Renaud LAILLER

■ **Personnalités scientifiques consultées par le groupe de travail**

M. Jean-Christophe AUGUSTIN

École nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort

M. Michel CATTEAU

Saint-Germain

M. Jean-Paul CHIRON

Faculté des sciences pharmaceutiques, Tours

Mme Christine VERNOZY-ROZAND

École nationale vétérinaire de Lyon, Marcy-l'Étoile

et Mmes et MM. les membres du comité d'experts spécialisé « Microbiologie ».

■ **Organismes extérieurs consultés**

AFAQ AFNOR Certification

ALLIANCE 7 (M. KENIGSWALD, Mme TENAILLEAU, Paris)

BLÉDINA (M. BERNARD, Villefranche-sur-Saône)

CARGILL (M. PAPI, Saint-Germain-en-Laye)

CELIA (M. ARROUY, Mme BENAZET, Craon)

INGREDIA (M. BOUDIER, Arras)

MEAD JOHNSON (Mme ALLONCLE, France et M. BOONE, M. KOK, Mme TOPS, Pays-Bas),

NESTLÉ (M. HEINTZ, Noisiel)

ROQUETTE FRÈRES (M. OLIVIER, M. VIDEAU, Lestrem),

SILL (M. BOUDIN, Plouvien)

SODILAC (Mme DOMIAR, Neuilly-sur-Seine)

L'Afssa remercie particulièrement l'équipe de direction du site de production de Blédina (Steenvoorde) pour la visite d'usine dont le groupe a pu bénéficier en début de mandat, ainsi que l'ensemble des personnes auditionnées par le groupe et travaillant pour le compte de groupes industriels impliqués dans le secteur de la production des préparations en poudre.

Liste des figures / <i>List of figures</i>	8
Liste des tableaux / <i>List of tables</i>	9
Liste des sigles et acronymes	10
Résumé du rapport / <i>Report summary</i>	12
Introduction / <i>Introduction</i>	15
Contexte et justification du projet / <i>Project justification and context</i>	15
1. Contexte / <i>Context</i>	15
2. Saisine / <i>Request</i>	17
3. Définition des produits considérés / <i>Definition of the products considered</i>	18
Organisation du travail du groupe / <i>Organisation of the group's work</i>	18
Champ d'application de l'expertise / <i>Assessment scope</i>	19
Section A - Procédés de fabrication des poudres de lait et des préparations en poudre	21
A-1. Poudres de lait	21
A-2. Préparations en poudre	22
A-3. Moyens de maîtrise	23
A-4. Conclusion	24
Section B - Méthodes d'analyse microbiologique utilisées pour la recherche des <i>Enterobacteriaceae</i>, <i>Salmonella</i> et <i>Enterobacter sakazakii</i> dans les préparations en poudre	28
B-1. Introduction	28
B-1.1. Définitions relatives aux méthodes d'analyse	28
B-1.2. Définitions relatives à l'état physiologique des bactéries	30
B-1.3. Systèmes et critères de validation	30
B-2. Principes généraux de validation de méthodes alternatives bénéficiant de la marque AFNOR Validation selon le référentiel NF EN ISO 16140	31
B-2.1. Exactitude relative, spécificité et sensibilité relatives	32
B-2.2. Niveau de détection relatif	33
B-2.3. Inclusivité, exclusivité	33
B-2.4. Praticabilité	34
B-3. Principales méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella</i> et <i>Enterobacter sakazakii</i> et critères de performance	34
B-3.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	35
B-3.2. <i>Salmonella</i>	36
B-3.3. <i>Enterobacter sakazakii</i>	40
B-4. Pertinence des résultats d'analyse obtenus par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR	46
B-4.1. Éléments nécessaires à la compréhension des résultats obtenus par PCR	46
B-4.2. Interprétation de résultats ne concordant pas avec les résultats obtenus par les méthodes classiques	47
B-4.3. Conclusion	52

Section C - Modélisation de la contamination et procédures d'échantillonnage	53
C-1 Contrôle de la production finale d'un lot.....	53
C-1.1. Modélisations de la fabrication et de la contamination.....	53
C-1.2. Plan d'échantillonnage.....	56
C-1.3. Stratégie d'analyse microbiologique.....	57
C-1.4. Sensibilité de la détection.....	58
C-1.5. Résultats du protocole.....	59
C-1.6. Considérations générales.....	59
C-1.7. Calculs numériques.....	60
C-1.8. Questions particulières.....	60
C-2 Interprétation d'une série de contrôles de lots.....	63
C-3 Exploration systématique des simulations numériques.....	70
Section D - Synthèse / Summary	81
D-1. Hygiène de la fabrication / <i>Production hygiene</i>	81
D-2. Méthodes d'analyse / <i>Analytical methods</i>	83
D-2.1. Validation des méthodes alternatives / <i>Validation of alternative methods</i>	83
D-2.2. Regroupement (« poolage ») des prises d'essais avant analyse.....	84
<i>Compositing of samples before analysis</i>	
D-2.3. Interprétation des résultats positifs obtenus par amplification en chaîne par polymérase (PCR) (voir le logigramme présenté en section B-4.2).....	84
<i>Interpretation of the positive results obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification (see the logical diagram presented in B-4.2)</i>	
D-3. Échantillonnage / <i>Sampling</i>	85
D-3.1. <i>Salmonella</i> / <i>Salmonella</i>	86
D-3.2. <i>E. sakazakii</i> / <i>E. sakazakii</i>	86
D-3.3. Choix du plan d'échantillonnage / <i>Choosing the sampling plan</i>	87
D-3.4. Objectifs de performance / <i>Performance objectives</i>	89
Section E - Réponses aux questions de la saisine / Answers to the questions raised in the request	90
E-1. Quelle est l'efficacité des méthodes d'échantillonnage et d'analyse mises en œuvre, dans le cadre de la recherche des <i>Enterobacteriaceae</i> et plus précisément de <i>Salmonella</i> et <i>E. sakazakii</i> dans les préparations en poudre?.....	90
<i>How effective are the sampling and analytical methods implemented to look for Enterobacteriaceae and more specifically Salmonella and E. sakazakii in powdered formulae?</i>	
E-1.1. Échantillonnage / <i>Sampling</i>	90
E-1.2. Méthodes d'analyse / <i>Analytical methods</i>	90
E-2. Quelle est la pertinence de réaliser des prélèvements d'échantillons environnementaux en complément des prélèvements réalisés sur produits finis, si la contamination est faible ou aléatoire?.....	90
<i>How relevant is it to take environmental samples in addition to samples from the finished products, if contamination is low or random?</i>	
E-3. Éléments scientifiques sur l'origine de la contamination du poste de lécithination.....	91
<i>Scientific facts on how the lecithination station became contaminated</i>	
E-4. Quelle est la pertinence des résultats d'analyse obtenus par méthode alternative de type PCR?.....	91
<i>How relevant are the analysis results obtained by PCR-type alternative method?</i>	
Recommandations / Recommendations	92

Annexes	94
Annexe I. Saisine de la DGAL, DGS et DGCCRF du 4 novembre 2005	94
Annexe II. Décision de création du groupe de travail du 17 mars 2006.....	96
Annexe III. Décision du 28 février 2007 apportant modification à la décision de création du groupe de travail du 17 mars 2006.....	98
Annexe IV. Questionnaire préparatoire, adressé aux représentants des groupes industriels auditionnés dans le cadre du groupe de travail.....	99
Annexe V. Tableau de synthèse des différentes méthodes normalisées ou validées, utilisées pour la recherche et/ou dénombrement des <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella</i> et <i>E. sakazakii</i> , à la date du 30 mars 2007.....	102
<i>Summary table of the different standardised or validated methods used to look for and/or count Enterobacteriaceae, Salmonella and E. sakazakii, as at 30 March 2007</i>	
Références bibliographiques	104

Figure 1 : Diagramme simplifié de la production de poudre de lait	22
<i>Simplified diagram of powdered milk production</i>	
Figure 2 : Principaux sites d'incorporation des ingrédients	23
<i>Main ingredient incorporation sites</i>	
Figure 3 : Logigramme d'interprétations d'un résultat positif obtenu par PCR	49
<i>Logical diagram interpreting a positive result obtained by PCR</i>	
Figure 4 : Représentation de la production d'un lot en fonction du temps	54
<i>Representation of the production of a batch over time</i>	
Figure 5 : Représentation des contaminations ponctuelles au cours de la production d'un lot	54
<i>Representation of occasional contamination while a batch is being produced</i>	
Figure 6 : Quelques exemples illustratifs de contamination	55
<i>Some illustrations of contamination</i>	
Figure 7 : Échantillonnage systématique	56
<i>Systematic sampling</i>	
Figure 8 : Exemple de protocole	57
<i>Protocol example</i>	
Figure 9 : Probabilité de détection en fonction de la masse analysée	58
<i>Detection probability depending on the weight analysed</i>	
Figure 10 : Réponse à la question Q1	61
<i>Response to question Q1</i>	
Figure 11 : Dériver considérées en question Q5	66
<i>Deviations considered in question Q5</i>	
Figure 12 : Exemple de suivi graphique de la détection des lots sur une longue période	69
<i>Example of graphical monitoring of the detection of batches over a long period</i>	
Figure 13 : P_d comme fonction de N_p et N_c	78
<i>P_d as a function of N_p and N_c</i>	
Figure 14 : P_d comme fonction de M_p et P_c	79
<i>P_d as a function of M_p and P_c</i>	

Liste des tableaux *List of tables*

Tableau 1 : Exemples d'actions et mesures de maîtrise, non exhaustifs, pouvant être appliquées au cours des étapes de production	25
<i>Non-exhaustive examples of control measures and actions that could be applied during the production steps</i>	
Tableau 2 : Exemples d'actions pouvant être menées sur le plan microbiologique	27
<i>Examples of actions that could be taken in microbiological terms</i>	
Tableau 3 : Expression des résultats de l'étude comparative du protocole de validation concernant l'exactitude relative, la spécificité relative et la sensibilité relative, selon la norme NF EN ISO 16140	33
<i>Expression of the results of the validation protocol benchmark study on relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity as per standard NF EN ISO 16140</i>	
Tableau 4 : Tableau de synthèse des critères de performance des méthodes de détection de salmonelles dans les aliments validées AAC relativement à l'ensemble des échantillons testés (au 30 mars 2007).....	41
<i>Summary table of the performance criteria of AAC-validated methods for detecting Salmonellae in foods with regard to all of the samples tested (as at 30 March 2007)</i>	
Tableau 5 : Tableau de synthèse des critères de performance des méthodes de détection de salmonelles dans les aliments validées AAC relativement aux échantillons des produits laitiers testés (au 30 mars 2007).....	42
<i>Summary table of the performance criteria of AAC-validated methods for detecting Salmonellae in foods with regard to the samples of dairy products tested (as at 30 March 2007)</i>	
Tableau 6 : Comparaison des critères de performance de différents milieux d'isolement sélectifs pour <i>E. sakazakii</i>	43
<i>Comparison of the performance criteria of different selective isolation media for E. sakazakii</i>	
Tableau 7 : Comparaison des critères de performance de méthodes de détection pour <i>E. sakazakii</i>	44
<i>Comparison of the performance criteria of E. sakazakii detection methods</i>	
Tableau 8 : Distinction possible entre les états physiologiques des cellules en fonction de la méthode PCR utilisée.....	51
<i>Possible distinction between the physiological states of cells depending on the PCR method used</i>	
Tableau 9 : Réponse à la question Q1	61
<i>Response to question Q1</i>	
Tableau 10 : Réponse à la question Q2.....	62
<i>Response to question Q2</i>	
Tableau 11 : Réponse à la question Q2b	63
<i>Response to question Q2b</i>	
Tableau 12 : Réponse à la question Q3.....	64
<i>Response to question Q3</i>	
Tableau 13 : Réponse à la question Q4.....	65
<i>Response to question Q4</i>	
Tableau 14 : Réponse à la question Q5.....	67
<i>Response to question Q5</i>	
Tableau 15 : Distribution des longueurs de séquences de détections simultanées	68
<i>Distribution of simultaneous detection sequence lengths</i>	
Tableau 16 : Présentation d'une partie des résultats des simulations.....	70
<i>Presentation of some of the simulation results</i>	

Liste des sigles et acronymes

AAC	AFAQ AFNOR Certification
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AESA	Autorité européenne de sécurité des aliments
AFAQ	Association française pour l'assurance de la qualité
AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme des longueurs des fragments d'amplification)
AFNOR	Association française de normalisation
Afssa	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AOAC	American Association of Official Chemists (Association américaine des chimistes officiels)
BET	Bromure d'éthidium
Bouillon EE	Bouillon tamponné à la bile, au vert brillant et au glucose
Bouillon EPT	Bouillon eau peptonée tamponnée
Bouillon RVS	Bouillon de Rappaport et Vassiliadis avec soja
Bouillon MKTTn	Bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate et à la novobiocine
Bouillon mLST	Bouillon au lauryl sulfate et au tryptose modifié
CCFH	Codex Committee for Food Hygiene (Comité du Codex sur l'hygiène alimentaire)
CEN	Comité européen de normalisation
CES	Comité d'experts spécialisé de l'Afssa
CI	Contrôle interne
COFRAC	Comité français d'accréditation
Cp	Crossing Point (Cycle seuil)
Ct	Cycle Threshold (Cycle seuil)
DFI	Druggan Forsythe Iversen
DG SANCO	Direction générale Santé et protection des consommateurs, Commission européenne.
DGAL	Direction générale de l'alimentation du ministère chargé de l'agriculture
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes du ministère chargé des finances
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Électrophorèse sur gel en gradient de dénaturation)
DGS	Direction générale de la santé du ministère chargé de la santé
EHEDG	European Hygienic Engineering and Design Group (Groupe européen d'ingénierie et de conception hygiénique)
EIL	Essai inter-laboratoires
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Dosage par absorption immuno-enzymatique)
EN	Norme européenne
ENV	École nationale vétérinaire
EPT	Eau peptonée tamponnée
ESIA	<i>Enterobacter sakazakii</i> isolation agar
FAM	Flore aérobique mésophile
FDA	Food and Drug Administration (Administration des aliments et médicaments, États-Unis)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
Gélose VRBG	Gélose à la bile, au cristal violet et au glucose
Gélose VRBL	Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre
Gélose XLD	Gélose au xylose, lysine et désoxycholate
Gélose GVB	Gélose au rouge de phénol et au vert brillant
Gélose ESIA	Gélose <i>Enterobacter sakazakii</i> Isolation Agar
Gélose TSA	Gélose Tryptone Soja Agar

- Gélose DFI** Gélose Druggan, Forsythe and Iversen
- Gélose ESPM** Gélose *Enterobacter sakazakii* chromogenic plating medium
- HACCP** Hazard Analysis Critical Control Point (Analyse des dangers – points critiques pour leur maîtrise)
- HMPA** Hygiène et microbiologie des produits alimentaires
- INRA** Institut national de la recherche agronomique
- InVS** Institut de veille sanitaire
- ISO** International organization for standardization (Organisation internationale de normalisation)
- LCR** Laboratoire communautaire de référence
- LOD** Limit of Detection (Limite de détection)
- JEMRA** Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment
(Consultations mixtes FAO/OMS d'experts de l'évaluation des risques biologiques)
- MSRV** Milieu modifié Rappaport et Vassiliadis avec soja
- NEN** Nederlands Normalisatie-Instituut (Institut néerlandais de normalisation)
- NEP** Nettoyage en place
- NF** Norme française
- NPP** Nombre le plus probable
- NPV** Negative Predictive Value (Valeur prédictive négative)
- O/F** (Milieu) Oxydation/Fermentation
- OMS** Organisation mondiale de la santé
- PCR** Polymerase Chain Reaction (Réaction d'amplification en chaîne par polymérase)
- RFLP** Restriction Fragment Length Polymorphism
(Polymorphisme des longueurs des fragments de restriction)
- PO** Objectif de performance
- PPV** Positive Predictive Value (Valeur prédictive positive)
- RNA** Acide ribonucléique
- RT-PCR** Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
- SC** Sous-comité
- TC** Technical Committee (Comité technique)
- TTGE** Temporal Temperature Gel Electrophoresis (Électrophorèse sur gel en gradient de température)
- VNC** Viable mais non cultivable
- WG** Working Group (Groupe de travail)

Une saisine de la Direction générale de l'alimentation, motivée par trois épidémies dues à la présence de bactéries pathogènes dans des préparations en poudre utilisées pour l'alimentation des nourrissons et des personnes âgées, portait sur l'efficacité des méthodes d'échantillonnage et d'analyse pour les *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter sakazakii* et *Salmonella*, l'utilité de prélèvements environnementaux, et la pertinence des résultats obtenus par PCR.

En réponse, le groupe de travail, constitué par le Comité d'experts spécialisé de l'Afssa, a fondé sa réflexion sur l'audition de représentants de sept entreprises productrices de préparations en poudre, la visite d'une usine et l'étude de la bibliographie. Le rapport comporte les parties décrites ci-après. La biologie et l'écologie de ces micro-organismes dans le contexte des préparations en poudre ne sont pas décrites dans le rapport car elles sont présentées de façon complète dans des documents récents émanant du Comité du *Codex alimentarius* sur l'hygiène alimentaire (CCFH), de deux consultations FAO/OMS (JEMRA) et de deux opinions de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs).

Fabrication des préparations en poudre

Les procédés de fabrication sont brièvement décrits, en insistant sur les points sensibles des lignes de fabrication et de leur environnement où la contamination microbologique peut survenir, se maintenir ou se multiplier. Les moyens de maîtrise essentiels pour l'hygiène sont soulignés et de nombreux exemples sont fournis.

Méthodes d'analyse

Cette section présente en premier lieu les définitions de termes et expressions utilisés dans le domaine des méthodes d'analyse, notamment en relation avec l'échantillonnage et la validation des méthodes alternatives. L'expérience montre qu'une mauvaise compréhension des concepts peut découler d'une utilisation insuffisamment maîtrisée du vocabulaire.

Les méthodes d'analyse disponibles en France pour les trois types de micro-organismes cités ci-dessus sont présentées. Une synthèse exhaustive des critères de performance des nombreuses méthodes existant pour *Salmonella* a été faite à partir des archives de l'organisme de validation (AFAQ AFNOR Certification ou AAC). Des améliorations souhaitables de la procédure de validation sont signalées dans le rapport.

A request from the Directorate General for Food, following three outbreaks caused by the presence of pathogenic bacteria in powdered formulae used as food for infants and elderly people, addressed the effectiveness of sampling and analysis methods for Enterobacteriaceae, Enterobacter sakazakii and Salmonella, the usefulness of environmental sampling and the relevance of results obtained by PCR.

The working group, composed by the Afssa's Scientific Panel, heard representatives from seven companies that produce powdered formulae, visited a factory and studied the bibliography to formulate its response. The report contains the parts described below. The biology and ecology of these microorganisms in the context of powdered formulae are not described in the report as comprehensive explanations of them are featured in recent documents from the Codex Committee on Food Hygiene (CCFH), two FAO/WHO consultations (JEMRA) and two opinions from the European Food Safety Authority (EFSA).

Manufacture of powdered formulae

The manufacturing processes are described briefly, focusing on the sensitive areas of the production lines and their environment in which microbiological contamination may occur, persist or spread. The key hygiene control methods are highlighted and a wide range of examples are given.

Analytical methods

This section begins by presenting the definitions of terms and expressions used in the field of analytical methods, particularly as regards sampling and the validation of alternative methods. Experience shows that a poor understanding of concepts may arise from an inadequate grasp of how to use the vocabulary.

The analytical methods available in France for the three types of microorganisms mentioned above are presented. An exhaustive review of the performance criteria of numerous methods existing for Salmonella has been carried out using the archives of the validation body (AFAQ AFNOR Certification/AAC). Desirable improvements in the validation procedure are highlighted in the report.

Une réflexion approfondie a été menée sur l'utilisation des méthodes moléculaires de type PCR en complément des méthodes conventionnelles. Pour aider les exploitants et le gestionnaire du risque à prendre des décisions, notamment en situation de crise, l'accent a été mis sur les modalités d'interprétation de résultats positifs obtenus par PCR. Un logigramme est proposé. Il repose sur l'utilisation de données complémentaires qu'il convient de rassembler: résultats d'analyse par une méthode conventionnelle, données épidémiologiques et connaissance du contexte de production.

Échantillonnage

En l'absence d'information, les hypothèses suivantes sont faites: (a) les lots de poudre peuvent n'être contaminés que ponctuellement (notion d'agrégativité); (b) dans les parties des lots qui sont contaminées, les bactéries sont réparties de manière uniforme; (c) les différents lots sont supposés produits dans les mêmes conditions. Les raisonnements sont ensuite basés sur la réalisation d'un échantillonnage systématique (prise d'essai faite à intervalle de temps constant). En effet, il a été démontré antérieurement qu'un tel échantillonnage est plus efficace qu'un échantillonnage aléatoire classique lorsque, comme c'est le cas ici, les contaminations sont très peu fréquentes et/ou aggrégatives.

Le rapport compare l'efficacité de plans d'échantillonnage, pour une masse donnée du lot, en prenant en compte non seulement le nombre de prises d'essai, mais aussi la charge microbienne supposée du lot, la proportion contaminée du lot, la masse et le nombre des prises d'essai, le regroupement de ces dernières en vue de l'analyse et la masse du regroupement qui est effectivement analysée.

Des stratégies sont suggérées pour la décision de rejet d'un lot en tenant compte des résultats des analyses des lots précédents. Deux cas sont envisagés: le niveau d'hygiène de la ligne de fabrication oscille autour d'une valeur moyenne de la contamination, ou une dérive entraîne l'augmentation du niveau de contamination.

In-depth discussions were held on the use of PCR-type molecular methods together with conventional methods. To help operators and the risk manager in their decision-making, particularly in times of crisis, the means for interpreting the positive results obtained by PCR were highlighted. A logical diagram is proposed, based on the use of extra data that need collecting: analytical results using a conventional method, epidemiological data and knowledge of the production context.

Sampling

In the absence of information, the following hypotheses were made: (a) powder batches can only occasionally be contaminated (notion of aggregativity); (b) in the parts of batches which are contaminated, the bacteria are spread out uniformly; (c) the different batches are assumed to be produced under the same conditions. The arguments are then based on carrying out systematic sampling (samples taken at constant time intervals). Indeed, it has previously been proved that such sampling is more effective than conventional random sampling when, as is the case here, contaminations are not very common and/or aggregative.

The report compares the effectiveness of sampling plans for a given batch weight, with account taken not only of the number of samples but also of the assumed microbial load of the batch, the contaminated proportion of the batch, the weight and the number of samples, the compositing of the latter in view of the analysis and the weight of the composite which is actually analysed.

Strategies are suggested for the decision to reject a batch by taking account of the analysis results for the previous batches. Two scenarios are envisaged: the hygiene level of the production line is around an average contamination value, or a drift brings about an increase in the contamination level.

Conclusions et recommandations

Des suggestions sont faites pour l'amélioration des procédures de validation des méthodes d'analyse microbiologiques alternatives, pour la transparence du processus et pour la publication par l'autorité compétente des méthodes reconnues.

Les difficultés, et parfois l'impossibilité de tirer une conclusion univoque des résultats obtenus par PCR sont soulignées.

Le fait que la protection du consommateur ne puisse être assurée par la seule analyse d'échantillons apparaît ici de façon caricaturale, du fait du très faible niveau de contamination par les micro-organismes considérés. La nécessité d'une approche intégrée et préventive de l'hygiène est donc patente pour les préparations en poudres. Il est recommandé que les autorités compétentes fixent des objectifs de performance aux exploitants, en tenant compte des modalités de reconstitution des biberons et des niveaux de sensibilité des différentes catégories de consommateurs à risque. Cette démarche impliquerait une évolution des techniques d'inspection officielle. Les exploitants et l'autorité compétente vérifieront l'obtention de ces objectifs au moyen d'une interprétation statistique des résultats d'analyse microbiologique obtenus pendant une longue période.

Conclusions and recommendations

Suggestions are made for improving alternative microbiological analytical method validation procedures, for the transparency of the process and for the publication by the competent authority of the recognised methods.

The difficulties, and sometimes the impossibility, of drawing a univocal conclusion of the results obtained by PCR are stressed.

The fact that consumer protection cannot be guaranteed by sample analysis alone appears exaggerated here because of the very low level of contamination by the microorganisms considered. The need for an integrated, preventive hygiene approach is therefore obvious for powdered formulae. It is recommended that the competent authorities set the performance objectives for operators by taking account of the baby bottle reconstitution means and the sensitivity levels of different categories of at-risk consumers. This approach would require official inspection techniques to be developed. Operators and the competent authority will check that these objectives are met through a statistical interpretation of microbiological analysis results obtained over a long period of time.

Contexte et justification du projet

1. Contexte

Au cours du mois de décembre 2004, une épidémie a touché la France, concernant quatre cas d'infection, dont deux décès, et cinq cas de colonisation digestive par *Enterobacter sakazakii*⁽¹⁾. Il s'agissait de nouveau-nés prématurés, tous hospitalisés dans un service de néonatalogie. Tous les cas avaient été alimentés avec le même produit. *E. sakazakii* était isolé de boîtes non ouvertes de préparation en poudre provenant des lots consommés par ces nouveaux-nés. Les investigations épidémiologiques ont montré que la contamination des lots de préparations en poudre impliqués était très faible, persistant pendant plusieurs mois et hétérogène. Les souches bactériennes étaient non différenciables (par électrophorèse en champ pulsé) des souches isolées chez les nouveaux-nés. Il s'agissait des premiers cas groupés en France d'infections par *E. sakazakii* associées à une préparation en poudre pour nourrissons contaminée et ayant entraîné le rappel du produit (Coignard and Vaillant 2006).

Durant cette même période, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESa) émettait (9 septembre 2004) un avis relatif aux risques microbiologiques liés à l'emploi de préparations pour nourrissons (infant formulae) et de préparations de suite (*follow-on formulae*). L'AESA recommandait l'utilisation de formules stérilisées liquides pour nourrir les nourrissons à haut risque (prématurés, nourrissons à faible poids de naissance ou immunodéprimés). Elle encourageait également la fixation d'un objectif de performance (PO)⁽²⁾ très faible pour la contamination de ces préparations en poudre par *Salmonella* et *E. sakazakii* (par exemple, absence de ces microorganismes dans 1, 10 ou 100 kg de produit) et la vérification du respect de cet objectif notamment par un suivi continu des *Enterobacteriaceae* dans ces produits et dans leur environnement de production. En complément, l'AESA encourageait l'émission de recommandations pour la préparation, la manipulation, l'entreposage et l'utilisation des préparations en poudre destinées aux nourrissons, au domicile et dans les hôpitaux.

(1) La dénomination *Cronobacter* n'est pas encore passée dans l'usage.

(2) **Objectif de performance (PO)**: la fréquence et/ou la concentration maximale d'un danger dans un aliment à une étape spécifiée de la chaîne alimentaire avant le moment de la consommation qui procure un objectif de sécurité des aliments ou un niveau approprié de protection sanitaire, selon le cas, ou qui contribue à son obtention.

Project justification and context

1. Context

In December 2004, an outbreak broke out in France, involving four cases of infection, including two deaths, and five cases of digestive colonisation by Enterobacter sakazakii⁽¹⁾. These concerned pre-term infants, all hospitalised in a neonatology department. All of the infants had been fed the same product. E. sakazakii was isolated in unopened tins of powdered formula coming from the batches consumed by these infants. The epidemiological investigations showed that contamination of the powdered formulae concerned was very low, persisting over several months and was heterogeneous. The bacterial strains could not be differentiated (by pulsed field electrophoresis) from the strains isolated in the infants. These were the first grouped cases in France of infections by E. sakazakii due to a contaminated powdered infant formula, and prompted the product to be recalled (Coignard and Vaillant 2006). Over the same period, the European Food Safety Authority (EFSA) issued (on 9 September 2004) an opinion on the microbiological risks associated with using infant formulae and follow-on formulae. EFSA recommended using sterilised liquid formulae to feed high-risk infants (pre-term, low birth weight or immunocompromised). It also encouraged a very low performance objective (PO)⁽²⁾ to be set for the contamination of these powdered formulae by Salmonella and E. sakazakii (for example, absence of these microorganisms in 1, 10 or 100kg of product) and compliance with this objective, particularly through ongoing monitoring of Enterobacteriaceae in these products and their production environment, to be checked. In addition, EFSA encouraged producing recommendations for preparing, handling, storing and using powdered infant formulae at home and in hospitals.

(1) The term *Cronobacter* is still not commonly used.

(2) **Performance Objective (PO)**: The maximum frequency and/or concentration of a hazard in a food at a specified step in the food chain before the time of consumption, that provides or contributes to a food safety objective or an appropriate level of health protection, as applicable.

C'est pourquoi, l'Afssa a été saisie le 3 novembre 2004 par la Direction générale de la santé (DGS) d'une demande de recommandations en matière d'hygiène pour la préparation des biberons en crèches et établissements hospitaliers. Le rapport final a été publié en juillet 2005 (Afssa 2005).

Une épidémie provoquée par *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Agona (*Salmonella* Agona), liée à la consommation de poudres de lait pour nourrissons de deux marques différentes mais produites sur une même chaîne, a également été rapportée entre mars et juin 2005. Fièvre et diarrhée (parfois sanglante) ont été observées chez au moins 141 nourrissons âgés de moins de 12 mois, mais aucun décès n'a été déclaré. Les investigations épidémiologiques et microbiologiques suggéraient des taux de contamination faibles et hétérogènes des lots de préparations en poudre impliqués, produits sur une durée limitée (Brouard *et al.* 2007).

Une épidémie due à *Salmonella* Worthington s'est déclarée en mai 2005, avec 21 cas de diarrhée avec ou sans fièvre, concernant des personnes âgées de plus de 60 ans, hébergées en établissement hospitalier de long séjour. L'origine alimentaire a été suspectée mi-juin 2005 après l'apparition de six nouveaux cas. Du lait demi-écrémé, utilisé pour compléter les plats chauds et froids des établissements concernés, a été mis en cause. L'inspection de la chaîne de production a révélé la présence de cette bactérie dans l'environnement de production.

Lors de ces trois épidémies, l'investigation a permis de mettre en évidence les points suivants :

- la possible contamination bactérienne par *Salmonella* et *E. sakazakii* de l'environnement des chaînes de production des préparations en poudre pour nourrissons et personnes âgées ;
- la non-détection de la contamination des lots, lors des contrôles libératoires effectués par les industriels avant la sortie des produits finis de l'usine. Plusieurs hypothèses pouvaient être avancées : la faible contamination des lots, le caractère ponctuel de la contamination et/ou l'inefficacité des méthodes de détection employées, en termes d'analyse microbiologique et de plan d'échantillonnage ;
- l'existence de pratiques à risque lors de l'utilisation des préparations en poudre.

Le rapport de l'Afssa publié en juillet 2005 présentait des éléments de réponse à ce dernier point et émettait des recommandations d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons, pour les crèches, les établissements hospitaliers, les autres structures d'accueil de la petite enfance et pour le domicile (Afssa 2005). La Direction générale de la santé, la Direction générale de l'alimentation (DGAL) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) ont conjointement saisi l'Afssa d'une

This is why Afssa received a request on 3 November 2004 from the Directorate General for Health (DGS) to formulate hygiene recommendations on preparing baby bottles in nurseries and hospitals. The final report was published in July 2005 (Afssa 2005).

An outbreak caused by Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona (Salmonella Agona), associated with the consumption of two different brands of powdered milk for infants that were produced in the same chain, was also reported between March and June 2005. Fever and diarrhoea (sometimes bloody) were observed in at least 141 infants less than 12 months old, although no death was declared. The epidemiological and microbiological investigations pointed to low, heterogeneous levels of contamination of the powdered formula batches concerned, produced over a limited period of time (Brouard et al. 2007).

An outbreak caused by Salmonella Worthington was announced in May 2005, with 21 cases of diarrhoea with or without fever, in elderly people over 60 years of age, living in a long-term hospital establishment. A food-borne infection was suspected in mid-June 2005 after the appearance of six new cases. Semi-skimmed milk, used to supplement hot and cold meals in the establishments concerned, was suspected. Inspection of the production chain revealed the presence of this bacterium in the production environment.

During these three outbreaks, investigations revealed the following points:

- *Possible bacterial contamination by Salmonella and E. sakazakii of the environment where the powdered formulae for infants and elderly people were produced;*
- *Contamination of the batches was not detected during the green-light inspections carried out by the manufacturers before the finished products left the factory. Several hypotheses could be put forward: low contamination of the batches, the occasional nature of the contamination and/or ineffectiveness of the detection methods used, in terms of microbiological analysis and sampling;*
- *Risky practices when the powdered formulae were used.*

Published in July 2005, Afssa's report presented facts in response to this last point and issued hygiene recommendations for the preparation, handling and storage of feeding bottles, for nurseries, hospitals, other young children's facilities and for the home (Afssa 2005). The Directorate General for Health, Directorate General for Food (DGAL) and the General Directorate for Competition Policy, Consumer Affairs and Fraud Control (DGCCRF) sent a joint request to Afssa to produce an opinion permitting the assessment of the control methods set up by professionals in this industry to prevent the hazards Salmonella, E. sakazakii and more generally bacteria from the Enterobacteriaceae family.

demande d'avis pour disposer d'éléments permettant d'évaluer les moyens de maîtrise mis en place par les professionnels de ce secteur pour lutter contre les dangers que sont *Salmonella*, *E. sakazakii* et plus généralement contre les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*.

2. Saisine

Dans ce contexte, les questions posées par la saisine sont les suivantes :

- apprécier l'efficacité des méthodes d'échantillonnage et d'analyse mises en œuvre, dans le cadre de la recherche des *Enterobacteriaceae* et plus précisément de *Salmonella* et *E. sakazakii* dans les préparations en poudre ;
- évaluer la pertinence de réaliser des prélèvements d'échantillons environnementaux en complément des prélèvements réalisés sur produits finis, si la contamination est faible ou aléatoire ;
- apporter des éléments scientifiques sur l'origine de la contamination du poste de lécithination ;
- évaluer la pertinence des résultats d'analyse obtenus par méthode alternative de type PCR.

Cette dernière question résulte de ce que, lors de l'alerte causée par *Salmonella* Agona en 2005, une discordance s'est manifestée entre les premiers résultats d'analyse obtenus par des méthodes de type PCR et par d'autres méthodes dites conventionnelles. C'est à partir des résultats négatifs des analyses conventionnelles, confortés par les données épidémiologiques, que la décision de ne pas retirer, ni de rappeler les lots concernés, a été prise.

Cette demande d'expertise a pour objectif de mettre à disposition des gestionnaires de santé et des industriels du secteur concerné, les éléments scientifiques d'aide à la décision pour l'évaluation et l'optimisation des moyens de maîtrise de la contamination des préparations en poudre par *Salmonella*, *E. sakazakii* et plus généralement *Enterobacteriaceae*, préparations consommées aux âges extrêmes de la vie.

2. Request

In this context, the tasks requested are as follows:

- *assess the effectiveness of sampling and analytical methods implemented to look for Enterobacteriaceae and more specifically Salmonella and E. sakazakii in powdered formulae;*
- *assess the relevance of taking environmental samples in addition to samples from the finished products, if contamination is low or random;*
- *provide scientific facts on how the lecithination station could become contaminated;*
- *assess the relevance of the analysis results obtained by PCR-type alternative method.*

The last point has been requested because, during the alert caused by Salmonella Agona in 2005, the first analysis results obtained by PCR-type methods and other so-called conventional methods were conflicting. The decision not to withdraw or recall the batches concerned was based on the negative results of the conventional analyses, backed up by epidemiological data.

The purpose of this assessment request is to provide managers and manufacturers in the sector concerned with scientific decision-aiding facts to assess and optimise the means for controlling contamination of powdered formulae by Salmonella, E. sakazakii and more generally Enterobacteriaceae; formulae which are consumed by the very young and the very old.

3. Définition des produits considérés

La Directive 2006/141/CEE⁽³⁾ fixe les normes de composition et d'étiquetage relatives aux préparations pour nourrissons et préparations de suite destinées aux nourrissons en bonne santé. Cette directive définit les produits considérés dans ce rapport comme suit :

- **préparations pour nourrissons** : denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons pendant les premiers mois de leur vie et répondant à elles seules aux besoins nutritionnels de ces nourrissons jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée ;
- **préparations de suite** : denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons lorsqu'une alimentation complémentaire appropriée est introduite et constituant le principal élément liquide d'une alimentation progressivement diversifiée de ces nourrissons.

Les nourrissons sont définis comme des enfants âgés de moins de douze mois.

Parmi les préparations en poudre, les aliments diététiques destinés aux personnes âgées, pour fournir une alimentation plus adaptée aux perturbations du processus d'assimilation ou du métabolisme, ne sont pas concernés par la directive 2006/141/CEE. Ces produits sont réglementés par le décret français n° 2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires⁽⁴⁾, qui transpose en droit français la directive 2002/46/CEE⁽⁵⁾.

À la connaissance du groupe, aucun guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP n'a été officiellement publié dans ce secteur alimentaire.

Organisation du travail du groupe

Pour mener cette expertise, un groupe multidisciplinaire a été constitué le 17 mars 2006, sur décision de la Directrice générale de l'Afssa. Ce groupe était composé de microbiologistes et d'hygiénistes, de membres de commissions mises en place par les organismes de normalisation (AFNOR, CEN et ISO) et de validation de méthode (AAC), d'une épidémiologiste (InVS), d'un biostatisticien et d'un représentant des laboratoires de la DGCCRF.

Le travail d'expertise a été organisé autour de trois sous-groupes nommés « **procédés** », « **méthodes** » et « **échantillonnage** », pour répondre aux objectifs structurants la saisine et la réflexion du groupe.

3. Definition of the products considered

Directive 2006/141/EC⁽³⁾ lays down the composition and labelling standards for infant formulae and follow-on formulae for healthy infants. It defines the products considered in this report as follows:

- infant formulae: foodstuffs intended for particular nutritional use by infants during the first months of life and satisfying by themselves the nutritional requirements of such infants until the introduction of appropriate complementary feeding;
- follow-on formulae: foodstuffs intended for particular nutritional use by infants when appropriate complementary feeding is introduced and constituting the principal liquid element in a progressively diversified diet of such infants;

Infants are defined as children under the age of 12 months.

Of the different types of powdered formulae, dietary foods for elderly people for the purposes of providing more suitable food for the disturbances of the metabolism or assimilation process are not covered by Directive 2006/141/EC. These products are regulated by French decree no. 2006-352 of 20 March 2006 on food supplements⁽⁴⁾, which transposes Directive 2002/46/EC⁽⁵⁾ into French law.

As far as the group is aware, no guide to good practice for hygiene and for the application of HACCP principles has been published officially in this food sector.

Organisation of the group's work

To conduct this assessment, a multidisciplinary group was created on 17 March 2006 at the decision of Afssa's Director General. This group was composed of microbiologists and hygienists, members of commissions set up by standardisation organisations (AFNOR, CEN and ISO) and method validation organisations (AAC), one epidemiologist (InVS), one biostatistician and one representative of DGCCRF laboratories.

The assessment work was organised into three sub-groups called "**processes**", "**methods**" and "**sampling**", to meet the founding objectives of the request and fuel the group's discussions.

(3) JO L401, 30.12.2006, p.1.

(4) JO n° 72 du 25 mars 2006 page 4543.

(5) JO L 183 p.51, du 10 juin 2002.

(3) JO L401, 30.12.2006, p.1.

(4) O.J. no. 72 of 25 March 2006, page 4543.

(5) JO L 183 p.51, of 10 June 2002.

L'organisation française représentant l'interprofession du secteur d'activité (Alliance7) a été contactée en début de mandat pour organiser la visite d'un site de production de poudre de lait. L'ensemble des membres du groupe de travail a ainsi pu visiter l'usine de production du groupe Blédina, située à Steenvoorde (Nord, France).

Au total, sept groupes industriels ont été auditionnés séparément, par respect de la confidentialité, pour que les membres du groupe de travail perçoivent les spécificités des différents procédés de fabrication, pour réunir des informations de « terrain », pour comprendre les difficultés rencontrées par les professionnels du secteur et pour recueillir leurs attentes. Afin de préparer et optimiser les échanges, un questionnaire (Annexe IV) avait été conçu et adressé à chaque industriel avant l'audition. Bien qu'ils n'aient pas été auditionnés, deux autres groupes industriels du secteur ont aussi souhaité répondre au questionnaire.

La progression du travail du groupe a fait l'objet de présentations régulières au Comité d'experts spécialisé (CES) « Microbiologie » de l'Afssa. Avant publication, ce rapport a été soumis à trois relecteurs du CES « Microbiologie » puis à l'ensemble du CES.

Champ d'application de l'expertise

L'expertise menée par les membres du groupe de travail a pris en considération uniquement les *Enterobacteriaceae*, et les deux dangers microbiologiques suivants : *Salmonella* et *E. sakazakii* dans le cadre de la production de préparations en poudre. Les membres du groupe de travail ont pris en compte toutes les étapes de la production jusqu'à la mise sur le marché des produits conditionnés, en incluant les ajouts d'ingrédients possibles.

Cette restriction de considération de deux dangers microbiologiques liés aux préparations en poudre ne doit pas laisser supposer qu'il s'agit des seuls pathogènes susceptibles de contaminer ces produits. En effet, *Bacillus cereus* devrait faire l'objet d'un ajout prochain au Règlement (CE) n° 2073/2005. L'ajout d'autres *Enterobacteriaceae* a également été évoqué, mais le rapport FAO/OMS de 2006 concluait à leur moindre importance en raison de leur résistance à la dessiccation inférieure à celle d'*E. sakazakii* (FAO/OMS 2006).

The French organisation representing the interprofession of the activity sector (Alliance7) was contacted at the beginning of the mandate to organise a visit to a powdered milk production site. All of the working group members were thus able to visit the Blédina production plant, located in Steenvoorde (Nord, France).

In total, seven industrial groups were heard separately, for confidentiality purposes, to give the working group members the opportunity to grasp the specific features of the different manufacturing processes, gather "field" information, understand the difficulties encountered by the professionals in the sector and to note their expectations. In order to prepare and optimise the exchanges, a questionnaire (Annex IV) was designed and sent to each manufacturer before the hearing. Although they were not heard, two other industrial groups in the sector also wanted to answer the questionnaire.

The group's work was presented regularly to Afssa's "Microbiology" scientific panel (CES). Before publication, this report was submitted to three rapporteurs from the "Microbiology" CES and then to the whole of the CES.

Assessment scope

The assessment conducted by the working group members focused solely on Enterobacteriaceae and the following two microbiological hazards: Salmonella and E. sakazakii in the production of powdered formulae. The working group members considered all of the production steps through to the marketing of packaged products, including any ingredient additions.

This restriction to two microbiological hazards associated with powdered formulae does not mean that these are the only pathogens likely to contaminate these products. Indeed, Bacillus cereus is due to be added shortly to Regulation (EC) No 2073/2005. The addition of other Enterobacteriaceae has also been mentioned, but the FAO/WHO 2006 report concluded that they were of lesser importance because of a weaker resistance to dehydration than E. sakazakii (FAO/WHO 2006).

Depuis les alertes sanitaires qui ont abouti à la mise en place de cette réflexion, le contexte législatif a évolué. Le « Paquet Hygiène » est en vigueur depuis le 1^{er} janvier 2006 et le règlement (CE) n° 2073/2005 définit des critères microbiologiques de sécurité et d'hygiène des procédés. À la date de publication de ce rapport, une réflexion est en cours⁽⁶⁾ au sein de la DG SANCO pour amender ce règlement et notamment les critères applicables aux préparations en poudre destinées aux nourrissons et jeunes enfants. Un avis de l'AESA, émis le 27 janvier 2007, a apporté des réponses concernant l'existence d'une corrélation ou non entre la présence de *Salmonella* et celle des *Enterobacteriaceae*, d'une part, et la concentration d'*E. sakazakii* et celle des *Enterobacteriaceae*, d'autre part, dans ces produits (Anonyme 2007). Notons que l'avis de l'AESA s'est appuyé sur des informations rassemblées par le groupe de travail de l'Afssa, avec l'accord des industriels concernés.

Dans l'esprit de la nouvelle législation européenne, les efforts doivent être portés tout au long de la chaîne alimentaire, incluant la production des matières premières, leur transformation, le conditionnement, l'entreposage et la distribution, ainsi que la reconstitution, l'entreposage et la consommation des produits par les particuliers ou les personnels hospitaliers, médicaux ou d'établissements de restauration collective. Les conclusions du présent rapport, qui s'intéresse à la maîtrise des procédés de fabrication des préparations lactées en poudre, doivent être prises en compte avec l'ensemble des conclusions des autres rapports concernant les autres étapes de la chaîne alimentaire. Pour cette raison, le présent rapport doit être considéré en complément des documents nationaux (Afssa 2005) et internationaux (Anonyme 2004; FAO/OMS 2004; FAO/OMS 2006; Anonyme 2007) déjà publiés, relatifs à cette problématique.

*Since the health alerts which sparked these discussions, the legislative context has changed. The "Hygiene Package" has been in force since 1 January 2006 and Regulation (EC) No 2073/2005 defines the microbiological safety and hygiene criteria for processes. At the date of publication of this report, discussions were under way⁽⁶⁾ within the Health and Consumer Protection Directorate General (DG SANCO) to amend this regulation, and particularly the criteria applying to powdered formulae for infants and young children. An EFSA opinion, issued on 27 January 2007, provided answers firstly as to whether a relationship exists between the presence of *Salmonella* and *Enterobacteriaceae* in these products and secondly on the concentration of *E. sakazakii* and *Enterobacteriaceae* in them (Anonyme 2007). Note that EFSA's opinion was based on information gathered by Afssa's working group, with the agreement of the manufacturers concerned.*

In light of the new European legislation, efforts must be made throughout the food chain, including the production of raw materials, their processing, packaging, storage and distribution, and the reconstitution, storage and consumption of products by families or staff in hospitals or collective catering establishments. The conclusions of this report, which concern controlling the manufacturing processes of powdered milk formulae, must be taken into account along with all other reports' conclusions on the other steps of the food chain. As a result, this report must be considered as a complement to national (Afssa, 2005) and international (Anonyme 2004; FAO/WHO 2004; FAO/WHO 2006; Anonyme 2007) documents that have already been published on this issue.

(6) Depuis la rédaction de ces lignes, le règlement (CE) n° 1441/2007 du 5 décembre 2007 a amendé le règlement (CE) n° 2073/2005 du 15 novembre 2005 dans ce sens.

(6) *Since the writing of this report, Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 has amended Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 in this regard.*

Section A

Procédés de fabrication des poudres de lait et des préparations en poudre

L'objectif de cette section est de décrire les méthodes de fabrication des préparations (lactées) en poudre pour nourrissons et personnes âgées en insistant plus particulièrement sur les points sensibles où les pathogènes considérés posent problème.

A-1. Poudres de lait

Les poudres de lait se définissent comme des produits résultant de l'enlèvement de l'eau du lait. En règle générale, une poudre de lait doit contenir moins de 4 % d'eau.

Pendant de nombreuses années, cette pratique fut employée pour faciliter le stockage des surplus laitiers ; ainsi, des quantités importantes de poudres de lait étaient produites, stockées puis distribuées. En effet, la dessiccation du lait a pour résultat la diminution des volumes et des masses permettant ainsi non seulement des facilités de stockage, mais également un transport plus facile et moins onéreux. De plus, cette transformation permet une augmentation intéressante de la durée de vie des produits du fait de l'inhibition des croissances microbiennes.

Cette opération de dessiccation comporte plusieurs étapes (tamisage, centrifugation, extraction, lyophilisation ou évaporation) et est schématisée en figure 1 (nous ne parlerons pas du séchage sur cylindre ou procédé Hamaker qui n'est pas utilisé en Europe pour les produits dont il est question ici).

Cette technologie employée depuis de nombreuses années, est relativement bien maîtrisée d'un point de vue hygiénique. En effet, la matière première (lait cru entier ou écrémé), avec des ingrédients qui peuvent lui être ajoutés, subit un traitement thermique appelé pasteurisation et correspondant à des traitements de 63 °C pendant 30 minutes, ou 72 °C pendant au moins 15 secondes, ou 85-90 °C pendant 1 à 2 secondes, permettant la destruction d'une proportion appropriée de micro-organismes pathogènes⁽⁷⁾.

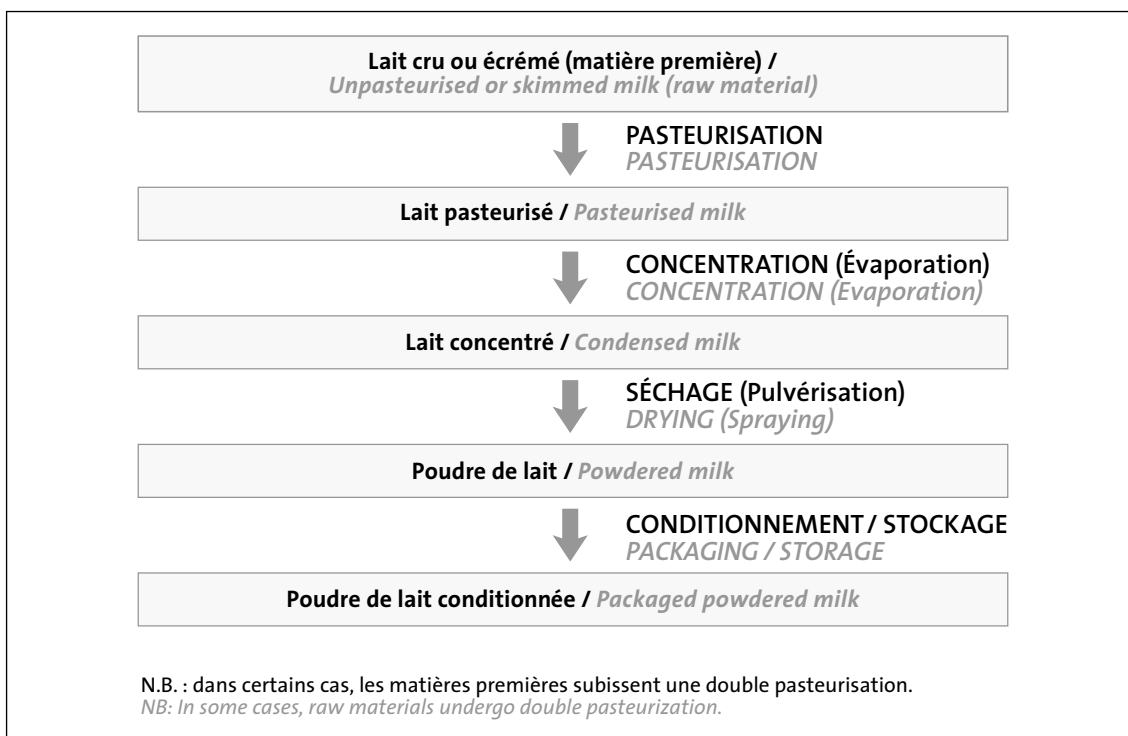
Ce traitement thermique est suivi par une étape de concentration par ébullition sous vide, de façon à réduire la teneur en eau du produit qui doit être séché.

Le séchage, par pulvérisation ou atomisation, se réalise dans un courant de gaz chaud de manière à obtenir une déshydratation rapide (Mahaut 2000). L'air utilisé est fréquemment filtré, puis chauffé à des températures très élevées (400 °C). Le produit à sécher est pulvérisé dans ce courant d'air chaud conduisant à sa déshydratation. Cette opération s'effectue dans une tour de séchage généralement de forme cylindrique, de plusieurs dizaines de mètres de hauteur, permettant la récupération des poudres dans la partie basse de cette structure. Il existe différents systèmes de pulvérisation (Mahaut 2000), notamment en ajoutant une étape ultérieure sur un lit fluidisé, destinée à faciliter la dissolution ultérieure de la poudre.

Dans ce procédé, la maîtrise de l'hygiène résulte non seulement de cette étape de pasteurisation, mais également de la possibilité de mettre en place des opérations de nettoyage et de désinfection basées sur les procédés de nettoyage en place (NEP) notamment dans les salles « humides » précédant l'étape de séchage.

(7) *Codex alimentarius* (CAC/RCP 57-2004) Code d'usages en matière d'hygiène pour le lait et les produits laitiers.

Figure 1: Diagramme simplifié de la production de poudre de lait
Figure 1: Simplified diagram of powdered milk production



A-2. Préparations en poudre

Depuis quelques années, ces poudres de lait sont parfois utilisées comme matières premières pour la fabrication de préparations destinées principalement à l'alimentation des enfants nés prématurément, des nourrissons et des jeunes enfants. D'autres formules sont également proposées (aliments diététiques destinés ou non à des fins médicales).

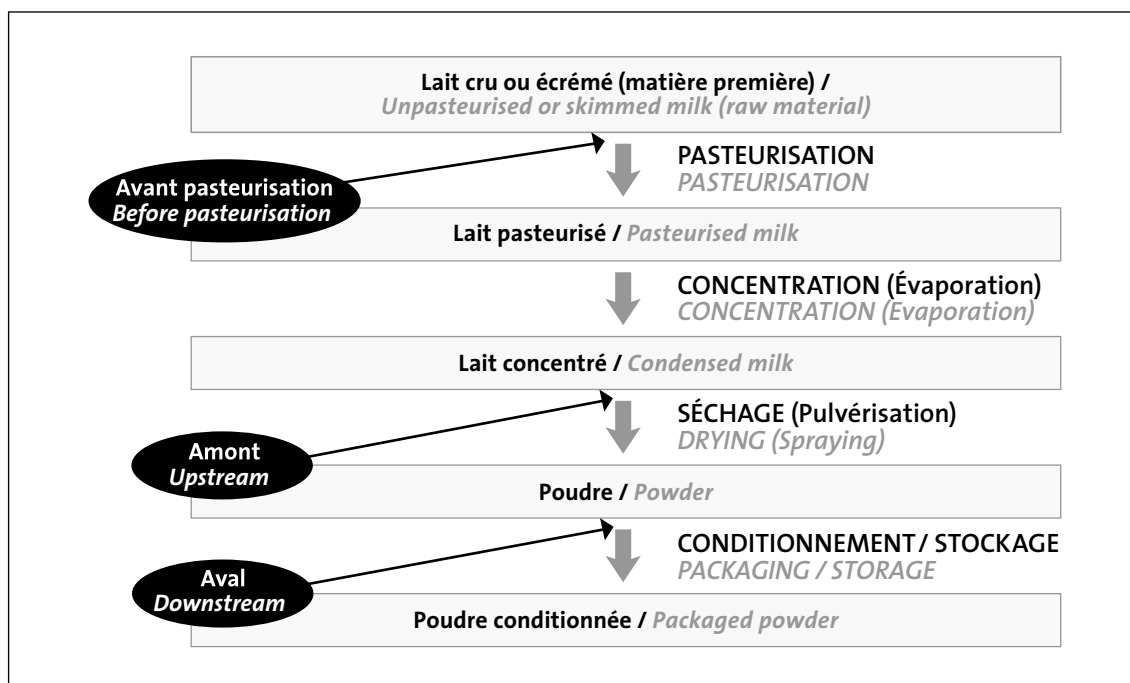
Dans ce cas, les poudres subissent des opérations complémentaires (figure 2) destinées à l'incorporation d'ingrédients divers (sucres et amidons, vitamines et minéraux, matières grasses végétales, protéines de soja, ferments et enzymes, etc.). Cette addition se réalise principalement en deux points (figure 2):

- en amont du poste de séchage, notamment pour les produits non pulvérulents; ainsi, les matières grasses végétales peuvent être incorporées sous une forme liquide; certains ingrédients peuvent même être incorporés avant le poste de pasteurisation;
- en aval de ce poste, notamment au niveau du lit fluidisé, pour les ingrédients en poudre ou ceux ne pouvant subir un traitement thermique, notamment certaines vitamines. L'adjonction de lécithine, réalisée pour la fabrication de certains produits, est effectuée à cet endroit (poste de lécithination).

Les points où se fait l'adjonction de ces différents ingrédients doivent être considérés comme des points sensibles dans le processus de fabrication, notamment pour les raisons suivantes:

- les ingrédients peuvent être contaminés; leur incorporation en aval de la tour de séchage et du lit fluidisé ne permettra pas, dans la majorité des cas, de réaliser une étape ultérieure de décontamination. De même, leur incorporation en amont de la tour de séchage mais après la pasteurisation laisse subsister un risque car le séchage n'est pas un traitement d'assainissement. Il conviendrait que les ingrédients ajoutés après séchage respectent les mêmes critères que ceux appliqués aux produits finis;
- lors de l'incorporation, il existe un risque certain de recontamination du produit (ingrédients et/ou poudre) du fait de l'ouverture des contenants et du système de production (bac de réception et de mélange). Cette contamination environnementale doit être considérée d'une manière globale: contamination de l'air dans une ambiance asséchée, personnel, présence de vecteurs animaux indésirables (rongeurs, insectes, etc.).

Figure 2 : Principaux sites d'incorporation des ingrédients
Figure 2: Main ingredient incorporation sites



A-3. Moyens de maîtrise

Comme pour toute entreprise agro-alimentaire, il est important de mettre en place toutes les mesures hygiéniques visant à assurer l'innocuité des produits. Cependant, les chaînes de fabrication des poudres de lait et des différents aliments pulvérulents fabriqués à partir de ces poudres, nécessitent une vigilance accrue sur le point suivant : **une séparation nette** est requise entre les zones humides (préparation des laits, homogénéisation, assemblage, écrémage, etc.) correspondant aux étapes précédant la pasteurisation de la matière première, zones humides où les *Enterobacteriaceae*, notamment *E. sakazakii* et *Salmonella* peuvent se développer, et les zones sèches correspondant aux étapes de séchage, d'assemblage et de conditionnement des poudres, étapes où la contamination par ces bactéries peut se produire. Dans la première de ces zones, les procédures de nettoyage et de désinfection sans démontage (NEP) peuvent être appliquées d'une manière rigoureuse en utilisant des produits liquides. Dans les secondes, les opérations de nettoyage et de désinfection sont principalement basées sur l'enlèvement régulier des poussières (aspiration) et la mise en place de procédés de décontamination adaptés n'entraînant pas d'humidification environnante et réalisés de manière régulière.

Quelle que soit la méthode utilisée, celle-ci doit faire l'objet d'une validation, puis d'une vérification régulière de son efficacité.

Dans cet esprit, il pourrait également être recommandé que le personnel employé sur ces chaînes de fabrication soit maintenu dans chacune de ces zones bien définies et notamment ne puisse pas passer de la zone humide à la zone sèche.

Les équipements doivent être conçus selon les normes hygiéniques adaptées. Celles-ci font l'objet de références européennes (EN 1672-2:1997) et internationales (EN ISO 14159:2002) sur les concepts de base en matière d'exigences hygiéniques lors de la conception d'équipements destinés aux industries agro-alimentaires. Dans le domaine plus spécifique des fabrications des poudres de lait et des préparations lactées à base de poudres, une documentation rédigée par l'European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG) propose des lignes directrices (« guidelines ») pour la conception hygiénique des tours de séchage et des lits fluidisés.

À titre illustratif et sans prétendre à l'exhaustivité, le Tableau 1 présente des exemples de mesures de maîtrise et d'actions qui peuvent être mises en œuvre au cours des différentes étapes de production. De même, le Tableau 2 présente des exemples d'action pouvant être menée dans le cadre de la réalisation des analyses microbiologiques. Des informations complémentaires sur la surveillance microbiologique de l'environnement de fabrication peuvent être trouvées dans la publication de l'ICMSF (2002). La norme ISO 18593 : 2004 fournit les modalités techniques appropriées pour faire les prélèvements d'environnement.

A-4. Conclusion

La fabrication de poudres de lait, et surtout de préparations en poudre avec adjonction de différents ingrédients, comporte un certain nombre d'étapes présentant des risques de contamination microbiologique des produits.

Si la contamination de la poudre peut être maîtrisée grâce au traitement thermique (pasteurisation) de la matière première et à un processus de concentration puis de séchage du lait dans des conditions hygiéniques adaptées, il n'en demeure pas moins que l'hygiène des étapes postérieures à la déshydratation, peut être difficile à maîtriser. Par conséquent, la mise en place de procédures d'hygiène strictes, allant de la conception des locaux (« zonage ») et des équipements, à l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection des installations, en passant par une gestion du personnel et des circuits de fabrication et de conditionnement des produits, s'avère indispensable. Il faut souligner l'importance de l'analyse microbiologique de prélèvements faits dans l'environnement et sur les équipements en complément de l'analyse microbiologique des ingrédients et des produits finis. La réglementation européenne rend obligatoire la surveillance des *Enterobacteriaceae* dans l'environnement. La recherche d'*E. sakazakii* et de *Salmonella* a une importance aussi grande.

Tableau 1 : Exemples d'actions et mesures de maîtrise, non exhaustifs, pouvant être appliquées au cours des étapes de production

Étapes et lieux	Points à surveiller	Actions, mesures de maîtrise et surveillance
Locaux et équipements	Zonage : séparation des zones humides et sèches	<ul style="list-style-type: none"> • Identification matérielle des zones et restriction d'accès, notamment installation de sas pour le personnel. • Vérification de l'absence d'eau et enregistrement du taux d'hygrométrie en zone sèche.
	Zonage : organisation des flux d'air	<ul style="list-style-type: none"> • Veiller à ce que la zone sèche soit en surpression, notamment par rapport à la zone humide.
	Murs, sols, plafonds et matériel	<ul style="list-style-type: none"> • Respect des règles fondamentales de conception hygiénique des locaux et du matériel (Mager <i>et al.</i> 2006). • Installation de sols en matériaux non poreux en zone sèche.
	Nettoyage et désinfection	<ul style="list-style-type: none"> • Application de plans efficaces et validés. • Après nettoyage et désinfection en zone sèche, élimination de l'eau. • Vérification de l'efficacité des opérations : <ul style="list-style-type: none"> - Analyses microbiologiques régulières, notamment aux points sensibles de la chaîne de production, situés en zone humide et en zone sèche ; - Surveillance des concentrations et des modes d'application des produits utilisés.
	Nuisibles (insectes, rongeurs, oiseaux, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> • Mise en place de systèmes efficaces de destruction et de piégeage. • Vérification et suivi régulier des résultats et de l'efficacité de la procédure.
	Filtration de l'air	<ul style="list-style-type: none"> • Vérification du taux d'encrassement des filtres (maintenance préventive).
	Qualité de l'eau utilisée (NEP)	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi microbiologique régulier.
Personnel	Degré de qualification du personnel permanent, saisonnier et intérimaire aux principes généraux d'hygiène	<ul style="list-style-type: none"> • Visite médicale d'embauche. • Formation et informations régulières. • Audit du plan de maîtrise sanitaire. • Formations spécifiques pour certains postes sensibles. • Attribution de postes en zones définies. • Respect des procédures vestimentaires (vêtements de couleurs différentes)...
Personnel	Accès de personnel extérieur (maintenance, contrôles, audit, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> • Respect des procédures d'hygiène. • Informations et recommandations relatives au comportement et à la gestuelle.
Matières premières et ingrédients	Fournisseurs	<ul style="list-style-type: none"> • Élaboration et mise en œuvre une procédure de qualification des fournisseurs. • Établissement de critères technologiques, physico-chimiques et microbiologiques. • Traçabilité des produits utilisés, y compris les ingrédients.
	Suivi des cahiers des charges	<ul style="list-style-type: none"> • Audits réguliers par du personnel qualifié. • Analyses microbiologiques. • Contrôles à réception permettant d'évaluer l'acceptabilité de la livraison. • Procédure de consigne ou de quarantaine en cas d'évaluation défavorable.
Traitement thermique (pasteurisation)	Barèmes appliqués lors du traitement	<ul style="list-style-type: none"> • Enregistrement des barèmes temps/température.
Conditionnement des poudres	Qualité des containers	<ul style="list-style-type: none"> • Vérification du degré de séchage de l'intérieur des containers.

Table 1: Non-exhaustive examples of control measures and actions that could be applied during the production steps

Steps & premises	Aspects to monitor	Control & monitoring measures & actions
Premises and equipment	Zoning: separation of dry and wet zones	<ul style="list-style-type: none"> Physical identification of zones and access restriction, particularly the installation of staff locks. Verification that there is no water present and recording of hygrometry levels in the dry zone.
	Zoning: organisation of air flows	<ul style="list-style-type: none"> Check that the dry zone is under higher pressure, particularly compared with the wet zone.
	Walls, floors, ceilings and equipment	<ul style="list-style-type: none"> Compliance with the basic rules of hygienic design of premises and equipment (Mager et al. 2006). Installation of floors in non-porous materials in the dry zone.
	Cleaning and disinfection	<ul style="list-style-type: none"> Application of effective and validated plans. After cleaning and disinfection of the dry zone, eliminate water. Verification that operations are effective: <ul style="list-style-type: none"> Regular microbiological analyses, particularly at the sensitive points of the production chain, located in the wet and dry zones; Monitoring of concentrations and application methods of the products used.
	Pests (insects, rodents, birds, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> Setup of effective destruction and trapping systems. Verification and regular follow-up of the results and effectiveness of the procedure.
	Air filtering	<ul style="list-style-type: none"> Verification of the clogging levels of filters (preventive maintenance).
	Quality of the water used (CIP)	<ul style="list-style-type: none"> Regular microbiological monitoring.
Staff	Qualification level of permanent, seasonal and temporary staff in general hygiene principles	<ul style="list-style-type: none"> Medical checkup upon hiring. Regular training and information. Audit of the food safety management system. Specific training for certain jobs at sensitive points. Allocation of jobs in defined zones. Compliance with clothing procedures (clothing in different colours), etc.
	Access of external personnel (maintenance, inspections, audit, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> Compliance with hygiene procedures. Information and recommendations on behaviours and movements.
Raw materials and ingredients	Suppliers	<ul style="list-style-type: none"> Drawing up and implementation of a supplier qualification procedure. Setting of technological, physicochemical and microbiological criteria Traceability of the products used, including ingredients
	Follow-up of specifications	<ul style="list-style-type: none"> Regular audits by qualified personnel. Microbiological analyses. Receipt inspections assessing the admissibility of the delivery. Instructions or quarantine procedure in the event of an unfavourable assessment.
Heat treatment (pasteurisation)	Time-temperature combinations applied during the treatment	<ul style="list-style-type: none"> Recording of time and temperature.
Packaging of powders	Quality of containers	<ul style="list-style-type: none"> Verification of how dry the insides of containers are.

Tableau 2 : Exemples d'actions pouvant être menées sur le plan microbiologique

Points essentiels	Modes d'action
Plan d'analyses microbiologiques des produits finis	<ul style="list-style-type: none"> • Définition d'objectifs pour <i>Enterobacteriaceae</i>, <i>Salmonella</i> et <i>E. sakazakii</i> en fonction de l'analyse des dangers, des réglementations en vigueur et de l'historique de l'entreprise.
Plan d'analyses microbiologiques de l'environnement	<ul style="list-style-type: none"> • Définition d'objectifs pour <i>Enterobacteriaceae</i>, <i>Salmonella</i> et <i>E. sakazakii</i> en fonction de l'analyse des dangers et de l'historique de l'entreprise.
Protocole des prélèvements des échantillons environnementaux	<ul style="list-style-type: none"> • Notice explicative de la procédure (affichage, diffusion).
Méthodes analytiques	<ul style="list-style-type: none"> • Application de méthodes validées. • Pour le suivi des productions, des méthodes internes à l'entreprise et acceptées par l'autorité compétente peuvent être utilisées mais en cas de détection, une vérification devra être faite par une méthode de référence ou une méthode alternative validée. • S'il est démontré (sous la responsabilité de l'exploitant en l'absence de méthode normalisée) que le regroupement (« poolage ») des prises d'essai n'affecte pas la limite de détection et la sensibilité de l'analyse pour <i>E. sakazakii</i>, il peut être pratiqué.
Analyse des tendances	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi régulier du nombre d'<i>Enterobacteriaceae</i> aux différents stades de la chaîne de production (points sensibles identifiés). • Mise en place de protocoles d'échantillonnages plus importants, dans l'espace et dans le temps, en cas de non-conformité des résultats.

Table 2: Examples of actions that could be taken in microbiological terms

Key points	Means of action
<i>Microbiological analysis plan of finished products</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Definition of objectives for Enterobacteriaceae, Salmonella and E. sakazakii based on the hazard analysis, current regulations and company's history.</i>
<i>Microbiological analysis plan of the environment</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Definition of objectives for Enterobacteriaceae, Salmonella and E. sakazakii based on the hazard analysis and company's history.</i>
<i>Environmental sampling protocol</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Procedure explanation (posters, distribution).</i>
<i>Analytical methods</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Application of validated methods.</i> • <i>For product follow-up, in-house methods that have been accepted by the competent authority may be used, but in the event of detection, a verification must be made by a reference method of validated alternative method.</i> • <i>If it is proven (by the operator in the absence of a standardised method) that the compositing of samples does not affect the detection limit or the analysis sensitivity for E. sakazakii, it may be carried out.</i>
<i>Trend analysis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Regular monitoring of the number of Enterobacteriaceae at different steps of the production chain (identified sensitive points).</i> • <i>Broader setup of sampling protocols in space and time should results not comply.</i>

Section B

Méthodes d'analyse microbiologique utilisées pour la recherche des *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* et *Enterobacter sakazakii* dans les préparations en poudre

B-1. Introduction

Une caractéristique commune des trois alertes sanitaires causées par *Salmonella* et *E. sakazakii*, à l'origine de la saisine de l'Afssa et de la création du groupe de travail, était l'absence de détection de la contamination des lots, lors des tests libératoires effectués par les industriels avant la sortie usine des produits finis. Trois hypothèses pouvaient être avancées : la faible contamination des lots, le caractère ponctuel de la contamination et/ou le manque de fiabilité des méthodes de détection employées en terme d'analyse microbiologique et de plan d'échantillonnage. Les objectifs du groupe de travail étaient donc d'apprécier l'efficacité des méthodes d'analyse, mais également d'évaluer la pertinence des résultats obtenus par des méthodes alternatives faisant appel à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). En effet, lors de l'alerte *Salmonella* Agona, des discordances avaient été observées entre des résultats d'analyse obtenus par des méthodes de type PCR et les méthodes dites conventionnelles (voir plus haut). Les membres du groupe devaient également émettre autant que possible des recommandations pour chaque constituant entrant dans le procédé de fabrication (lécithine de soja, par exemple).

Avant de développer les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* et *E. sakazakii*, il nous a semblé opportun d'introduire dans cette section les définitions des différents types de méthodes d'analyse (de référence, normalisée, spécification technique, horizontale, de routine normalisée, alternative) ainsi que la définition des mots « prélèvement », « échantillon » et « prise d'essai ». Dans le même esprit, les critères de validation des méthodes ont été développés.

L'efficacité des méthodes conventionnelles d'analyse dépend considérablement de l'état physiologique des bactéries. Ceci doit être présent en mémoire lorsque des résultats discordants sont obtenus par des méthodes reposant sur les techniques différentes, par exemple culture et PCR. Aussi il nous a semblé utile de proposer des définitions pour différents états physiologiques des bactéries.

Les méthodes microbiologiques validées pour l'analyse des contaminations dans l'environnement industriel sont indiquées ci-dessous. Pour les modalités de prélèvement, il est recommandé de respecter la norme ISO 18593 : 2004.

B-1.1. Définitions relatives aux méthodes d'analyse

- **Méthode de référence :** méthode reconnue et largement acceptée par les différentes parties concernées.
NOTE 1: Le niveau de reconnaissance dépend du niveau de référence visé. Par exemple, une méthode de référence internationale requiert une reconnaissance au niveau international.
NOTE 2: En France et en Europe, les méthodes de référence en microbiologie des aliments sont les méthodes normalisées par le CEN et l'ISO (voir en particulier le Règlement (CE) n° 2073/2005 sur les critères microbiologiques).
- **Méthode normalisée :** méthode faisant l'objet d'une norme soit nationale (publiée par l'AFNOR en France), soit européenne (publiée par le CEN), soit internationale (publiée par l'ISO).
NOTE 1: Toutes les normes CEN doivent être reprises en normes nationales pour les pays membres du CEN, et les normes nationales sur le même sujet sont supprimées dans un délai maximal de six mois. Les normes ISO sont reprises de façon facultative dans les collections nationales de normes. En microbiologie des aliments, la France reprend généralement les normes ISO en normes françaises.
NOTE 2: Les structures de normalisation en microbiologie des aliments, au niveau européen (CEN/TC 275/WG 6⁽⁸⁾) et au niveau international (ISO/TC 34/SC 9⁽⁹⁾) sont toutes les deux sous responsabilité française.

(8) Groupe de travail 6 « Contaminants microbiens » du Comité technique 275 « Analyse des aliments – Méthodes horizontales » du CEN.
(9) Sous-Comité 9 « Microbiologie » du Comité Technique 34 « Produits alimentaires » de l'ISO.

- **Spécification Technique ISO**: publication de l'ISO se distinguant d'une norme par son statut temporaire. Elle a une durée de vie limitée (en général trois ans), et au bout de cette période, le comité ISO qui l'a élaborée doit décider, sur la base des commentaires reçus, de sa mise en œuvre, de sa transformation en norme après prise en compte des commentaires ou de sa suppression. Ce statut peut être choisi pour un sujet nouveau, qui est encore en évolution ou pour lequel le niveau de consensus n'est pas encore complet. Il peut être également choisi pour publier rapidement un texte, car le processus d'adoption est simplifié.

- **Méthode horizontale**: méthode normalisée en microbiologie des aliments s'appliquant à l'analyse d'une grande variété d'échantillons: aliments pour l'homme et pour les animaux, environnement de transformation et de distribution des aliments, environnement de production primaire (élevage).

NOTE 1: Il est important de noter que les méthodes horizontales normalisées sont conçues de façon à pouvoir être utilisées d'abord pour des analyses répétées (contrôles de routine ou de référence) et pour un spectre très large de matrices. Dans le cas d'investigation d'épidémie, où il est nécessaire d'obtenir une probabilité maximale de détection du germe pathogène recherché dans une matrice spécifique, il peut être nécessaire d'adapter la méthode horizontale normalisée et de l'optimiser pour la matrice considérée.

- **Méthode de routine normalisée**: méthode normalisée par l'AFNOR en microbiologie des aliments et simplifiée par rapport à la méthode de référence correspondante.

Exemples: une gélose d'isolement au lieu de deux pour les méthodes de détection, et jusqu'à maintenant une boîte par dilution au lieu de deux pour les méthodes de dénombrement.

- **Méthode alternative**: méthode d'analyse permettant de déterminer ou d'estimer, pour une catégorie de produits donnée, le même analyte⁽¹⁰⁾ que celui mesuré avec la méthode de référence correspondante (d'après NF EN ISO 16140).

- **Méthode alternative validée AFNOR**: méthode alternative commercialisée, (ayant été validée par AFAQ AFNOR Certification - dans le cas d'AFNOR), et ayant fait l'objet d'une démonstration que cette méthode apporte un niveau de confiance approprié sur le fait que les résultats obtenus avec cette méthode sont comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence correspondante (d'après NF EN ISO 16140).

NOTE 1: Le fait qu'une méthode soit certifiée AFNOR VALIDATION signifie que le laboratoire peut l'utiliser en remplacement de la méthode de référence et qu'il peut être accrédité COFRAC sur la méthode ainsi validée. Toute méthode bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION nécessite la confirmation d'un signal positif du test.

- **Prélèvement (élémentaire)**: quantité de matière prélevée en une seule fois dans une quantité de matière plus importante (ISO 7002).

- **Échantillon**: ensemble composé d'un ou plusieurs individus (ou prélèvements) sélectionnés de différentes façons dans une population (ou dans une importante quantité de matière). Il est destiné à fournir une information caractéristique de la population (ou de la matière) étudiée, et éventuellement à servir de base à une décision concernant cette population ou cette matière ou le procédé qui l'a produite.

Un **échantillon représentatif** est un échantillon dans lequel on retrouve les caractères du lot d'où il provient. C'est notamment le cas lorsque chacun des individus ou des prélèvements élémentaires à choisir dans le lot a la même probabilité de figurer dans l'échantillon (échantillon aléatoire simple) (d'après Lignes Directrices du *Codex alimentarius* sur l'échantillonnage des aliments, CAC/GL 50/2004).

- **Prise d'essai**: quantité de matière prélevée dans l'échantillon [...] et sur laquelle est effectué l'essai (ou l'analyse) (selon ISO 6206).

Dans le cas de l'analyse microbiologique, il s'agit de la partie de l'échantillon pour essai introduite dans le premier bouillon d'enrichissement (méthodes de détection) ou dans le diluant pour préparer la suspension mère (méthodes de dénombrement).

(10) Analyte: ce que l'on cherche à analyser.

B-1.2. Définitions relatives à l'état physiologique des bactéries

- **Viable**: capable de se multiplier de façon visible à l'œil nu dans ou sur un milieu de culture de laboratoire.
- **Viable mais non cultivable (VNC)**: incapable de se multiplier de façon visible dans ou sur un milieu normalement apte à la culture, même après revivification, mais manifestant une activité métabolique résiduelle, et dont la possibilité de se multiplier un petit nombre de fois n'est pas exclue.

B-1.3. Systèmes et critères de validation

Le choix des méthodes normalisées se fait d'abord sur la base d'un consensus, au niveau national, européen ou international, selon qu'il s'agit d'une norme nationale, CEN ou ISO. Pour les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO, ce choix se fonde sur au moins des études publiées, et sur des essais effectués par les membres du CEN/TC 275/WG 6 et de l'ISO/TC 34/SC 9. La politique actuelle est de valider ces méthodes normalisées par des essais inter-laboratoires (EIL), qui permettent d'estimer leur fidélité (répétabilité et reproductibilité pour les méthodes quantitatives). Ainsi, la méthode normalisée de référence pour la détection des *Salmonella* (NF EN ISO 6579) a été validée par essai inter-laboratoires.

En ce qui concerne les méthodes alternatives et afin d'avoir des garanties sur leur fiabilité, il est recommandé de ne les utiliser en remplacement des méthodes de référence normalisées qu'à condition qu'elles aient été validées par rapport à ces méthodes de référence, cette validation permettant principalement d'établir une équivalence entre la méthode alternative et la méthode de référence correspondante. La validation d'une méthode alternative par rapport à la méthode de référence correspondante est en particulier une exigence du Règlement (CE) n° 2073/2005 sur les critères microbiologiques (Article 5), exigence applicable aux auto-contrôles effectués par les professionnels et aux contrôles officiels.

Pour la commercialisation des méthodes alternatives, différents systèmes de validation ont été mis en place au niveau international. Il s'agit, à notre connaissance, des systèmes suivants :

- Marque AFNOR Validation, gérée par AFAQ AFNOR Certification (AAC) comme organisme certificateur ;
- MicroVal, système à vocation européenne, incluant plusieurs organismes certificateurs et coordonné par le NEN (organisme néerlandais de normalisation) ;
- NordVal, organisme fédérant les pays scandinaves ;
- AOAC International, situé aux États-Unis, avec son système de validation principal appelé « Official Methods », prévoyant en particulier une validation complète avec essai inter-laboratoires ;
- AOAC Research Institute, gérant un système de validation simplifié, appelé « Performance Tested », sans essai inter-laboratoires, et applicable spécifiquement aux méthodes commercialisées.

Seuls les deux premiers systèmes correspondent à une certification : outre la validation technique des méthodes alternatives, effectuée par les cinq systèmes, la tierce-partie est organisée selon des règles strictes, définies dans un référentiel normalisé, et le système qualité du site de fabrication des méthodes commercialisées doit répondre à des exigences particulières généralement vérifiées par audits. Ce dernier aspect permet de s'assurer que la qualité de la méthode validée restera pendant toute la durée de validité du certificat de validation au même niveau que celui établi lors de l'étude expérimentale initiale.

La validation AFNOR (NF V03-100) mise en place avant l'apparition du référentiel NF EN ISO 16140 comprenait une étape d'étude préliminaire incluant une étude de « spécificité sur souches pures » (notion remplacée par « inclusivité et exclusivité » dans la norme NF EN ISO 16140), une étude de la limite de détection intrinsèque de la méthode évaluée sur souches pures, une étude de limite de détection dans les matrices alimentaires après contaminations artificielles d'au moins quatre types de matrice différentes par quatre souches et à cinq niveaux de contamination incluant le niveau zéro. Une étude de justesse était également réalisée sur des produits naturellement contaminés de préférence, ou artificiellement contaminés avec des souches stressées et sans dépasser un certain quota. Les échantillons étaient ensuite soumis à l'analyse de détection en double par la méthode alternative à valider et la méthode de référence. Une étude de praticabilité de la méthode alternative était également réalisée. Au vu des résultats, l'étude préliminaire était complétée par une étude collaborative incluant un nombre suffisant de laboratoires français et étrangers de façon à pouvoir exploiter correctement les résultats d'au moins huit laboratoires participants. Cette étude consistait à analyser en aveugle par la méthode alternative, pour chaque laboratoire deux réplicats d'échantillons artificiellement contaminés à trois niveaux (faible, moyen et fort) ainsi que les échantillons non contaminés, soit au total huit échantillons analysés par laboratoire.

La validation était accordée pour quatre années suite à l'examen des résultats de l'étude préliminaire, de l'étude collaborative et de l'audit réalisé auprès du fabricant de la méthode demandant la validation.

Dans le cadre de la validation des méthodes alternatives, la comparaison de la méthode alternative à la méthode de référence est effectuée selon un protocole très précis (norme NF EN ISO 16140). Un certain nombre de critères de performance sont estimés, pour la plupart en comparaison à la méthode de référence :

- pour les méthodes qualitatives :
 - justesse, limite de détection, inclusivité/exclusivité (sur souches pures), estimés par une étude intra-laboratoire,
 - justesse par un essai inter-laboratoires ;
- pour les méthodes quantitatives :
 - linéarité/justesse, limite de détection et limite de quantification, inclusivité/exclusivité (sur souches pures) estimés par une étude intra-laboratoire,
 - répétabilité et reproductibilité par un essai inter-laboratoires.

Actuellement, le référentiel de validation (NF EN ISO 16140) est en révision, au sein d'un groupe de travail de l'ISO/TC 34/SC 9. Outre une mise à jour, la correction des erreurs ou la levée d'imprécisions, il est prévu que cette révision porte essentiellement sur la validation des méthodes quantitatives, notamment sur le traitement statistique des résultats des études expérimentales, aspect qui nécessite clairement une amélioration.

À noter que la norme NF EN ISO 16140, si elle correspond, en tant que norme ISO, à la référence de choix au niveau international, n'est pas reconnue dans son intégralité par les USA, dont le référentiel de validation est établi par l'AOAC. Si la dernière version du protocole AOAC a fait l'objet d'un effort notable d'harmonisation avec la norme (définitions, nombre minimal d'échantillons pour les essais inter-laboratoires « EIL », etc.), des différences subsistent. La plus importante tient au fait que le protocole AOAC comprend une étude préliminaire plus restreinte que le protocole normalisé, mais demande la mise en place d'un EIL plus lourd, avec l'utilisation de plusieurs matrices. La norme, elle, prévoit une étude préliminaire développée, menée par le laboratoire expert pour estimer certains critères de performance de la méthode alternative, dont la justesse de cette méthode par rapport à la méthode de référence, alors que l'EIL n'est mené que sur une seule matrice. Le laboratoire expert est choisi par le demandeur sur une liste de laboratoires accrédités pour le micro-organisme d'intérêt, établie par AFAQ AFNOR Certification. Les deux protocoles de validation se distinguent alors principalement par le mode de contamination. D'un côté, la norme prévoit une utilisation majoritaire et prioritaire de la contamination naturelle pour estimer la justesse dans l'étude préliminaire ; ce qui rend l'appréciation de ce critère de performance majeur plus réaliste et proche des performances de la méthode en conditions normales d'utilisation. D'un autre côté, l'AOAC met l'accent sur l'EIL, ne pouvant être effectué que sur des échantillons artificiellement contaminés⁽¹¹⁾, ce qui permet d'estimer de façon approfondie la variabilité inter-laboratoires de la méthode (soit la répétabilité et la reproductibilité, dans le cas de méthodes quantitatives).

B-2. Principes généraux de validation de méthodes alternatives bénéficiant de la marque AFNOR Validation selon le référentiel NF EN ISO 16140

Le référentiel NF EN ISO 16140 a été mis en application en France en 2006. Le protocole de validation comprend globalement deux étapes :

- une **étude comparative** de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence réalisée au sein d'un laboratoire expert ;
- une **étude collaborative** de chacune des deux méthodes organisée par le laboratoire expert et à laquelle participent au minimum 12 laboratoires français et/ou étrangers.

L'**étude comparative** se décompose par la mesure de différents paramètres, et fait l'objet d'un rapport confidentiel présenté devant le bureau technique de validation et examiné par deux rapporteurs. L'objectif de l'étude est de comparer les performances de la méthode alternative et de la méthode de référence pour les paramètres suivants :

- exactitude relative, spécificité relative, sensibilité relative ;
- niveau de détection relatif ;
- inclusivité, exclusivité ;
- praticabilité.

(11) Afin de pouvoir maîtriser l'homogénéité de contamination des échantillons distribués aux laboratoires.

B-2.1. Exactitude relative, spécificité et sensibilité relatives

Lorsque la méthode doit être validée pour toutes les catégories de produits alimentaires, au minimum quatre catégories d'aliments destinées à l'alimentation humaine doivent être analysées ; il s'agit en ce qui concerne les salmonelles :

- des produits carnés incluant obligatoirement des produits de volailles ;
- des produits laitiers incluant obligatoirement des fromages au lait cru ;
- des ovoproduits incluant obligatoirement de la mayonnaise ;
- des produits végétaux et produits de la mer.

Soixante échantillons au total doivent être analysés pour chacune des catégories citées avec un ajustement de façon à obtenir dans chaque catégorie approximativement 50 % de résultats positifs et 50 % de résultats négatifs. L'analyse doit porter de préférence sur des échantillons naturellement contaminés, cependant il est possible de recourir à des contaminations artificielles d'aliments dans une certaine mesure, à condition de ne pas dépasser le seuil de 75 % d'échantillons artificiellement contaminés.

La contamination artificielle doit respecter certains principes et peut être réalisée de trois façons :

- a) contamination par mélange avec des échantillons naturellement contaminés ;
- b) contamination avec des souches isolées du même type de produit et ayant subi un stress physique ou chimique décrit dans le protocole AAC, représentatif des conditions naturelles ;
- c) utilisation de matériaux de référence.

L'analyse par les deux méthodes est menée dans la mesure du possible sur le même échantillon et la même prise d'essai dès la première étape. Dans le cas où il n'y a pas d'étape commune entre les deux méthodes, l'échantillon à analyser doit être homogénéisé au maximum, et en cas de contamination artificielle, l'inoculation a lieu sur chacune des prises d'essai, sauf dans le cas d'échantillons liquides pour lesquels l'inoculation a lieu directement dans l'échantillon avant la séparation en deux prises d'essai.

Les analyses sur l'ensemble des échantillons sont réalisées en simple par les deux méthodes avec un minimum de 60 produits par catégorie dont un minimum de 30 produits positifs.

Le laboratoire expert devra systématiquement confirmer tous les échantillons positifs ainsi que tous les échantillons discordants.

Les résultats sont exprimés sous forme de tableau de synthèse général (Tableau 3) et en fonction des différentes catégories de produits, considérant les définitions suivantes :

- **Exactitude relative (AC)** : niveau de correspondance entre la réponse obtenue avec la méthode de référence et la réponse obtenue avec la méthode alternative sur des échantillons identiques ;
- **Déviabilité positive (PD)** : correspond à un résultat positif pour un échantillon donné par la méthode alternative alors que celui de la méthode de référence est négatif. Une déviabilité positive devient un faux résultat positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est négatif. Une déviabilité positive est considérée comme vrai positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif ;
- **Déviabilité négative (ND)** : correspond à un résultat négatif par la méthode alternative pour un échantillon donné alors que la méthode de référence est positive. Une déviabilité négative devient un faux résultat négatif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif ;
- **Sensibilité relative (SE)** : capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte lorsque la méthode de référence le détecte ;
- **Spécificité relative (SP)** : capacité de la méthode alternative à ne pas détecter l'analyte lorsque la méthode de référence ne le détecte pas.

Tableau 3 : Expression des résultats de l'étude comparative du protocole de validation concernant l'exactitude relative, la spécificité relative et la sensibilité relative, selon la norme NF EN ISO 16140

Table 3: Expression of the results of the validation protocol benchmark study on relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity as per standard NF EN ISO 16140

Réponses <i>Responses</i>	Méthode de référence positive (R+) <i>Positive reference method (R+)</i>	Méthode de référence négative (R-) <i>Negative reference method (R-)</i>
Méthode alternative positive (A+) <i>Positive alternative method (A+)</i>	Accords positifs +/+ (PA) <i>Positive agreements +/+ (PA)</i>	Déviations positives (PD) (R-/A+) <i>Positive deviations (PD) (R-/A+)</i>
Méthode alternative négative (A-) <i>Negative alternative method (A-)</i>	Déviations négatives (ND) (A-/R+) <i>Negative deviations (ND) (A-/R+)</i>	Accords négatifs -/- (NA) <i>Negative agreements -/- (NA)</i>

Les critères sont exprimés selon les formules suivantes :

- exactitude relative AC = (PA+NA)/N avec N = nombre total d'échantillons analysés ;
- spécificité relative SP = NA/N- avec N- : nombre total d'échantillons négatifs avec la méthode de référence ;
- sensibilité relative SE = PA/N+ avec N+ : nombre total de résultats positif avec la méthode de référence.

B-2.2. Niveau de détection relatif

Définition

Le niveau de détection relatif correspond au nombre le plus petit de micro-organismes cultivables qu'il est possible de détecter dans l'échantillon avec une probabilité de 50 %.

Mesure

Différentes combinaisons « produit alimentaire - souche » doivent être étudiées en parallèle avec la méthode de référence et la méthode alternative pour cinq catégories de produits alimentaires (dont le lait cru obligatoirement pour *Salmonella*). Pour chaque combinaison « aliment - souche » au minimum 4 niveaux de contamination doivent être réalisés y compris un témoin négatif.

Le premier niveau est le niveau zéro, le second doit correspondre à une détection de moins de 50 % des répliqués, le 3^e correspond à une détection de plus de 50 % et de moins de 100 % des répliqués et le 4^e niveau correspond à une détection de 100 % des échantillons. Pour réaliser cette mesure, chaque combinaison « aliment - souche / niveau de contamination » est répliquée six fois et est analysée par les deux méthodes.

Le niveau de détection relatif sera estimé par le calcul du point limite à 50 % (LOD₅₀) avec un intervalle de confiance associé, suivant la méthode de calcul de Spearman-Kärber. Ce point limite donne l'estimation du niveau de contamination qui correspondrait à 50 % de détection.

B-2.3. Inclusivité, exclusivité

Définitions

L'inclusivité est la capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte cible à partir d'un large éventail de souches.

L'exclusivité est l'absence d'interférences par un éventail approprié de souches non cibles de la méthode alternative.

Bien qu'apparentées, ces notions ne sont pas identiques à celles de sensibilité et spécificité.

Mesure

Celle-ci se fait en analysant au moins 50 souches pures du micro-organisme cible et 30 souches pures de micro-organisme non cible connues pour être interférentes avec les souches cibles. Chaque analyse est réalisée sur souche pure en réalisant le protocole complet de la méthode. L'analyse sur les souches négatives est réalisée sur le milieu final d'enrichissement de la méthode avec une inoculation au minimum de 10⁶ bactéries/ml. Lorsque la méthode alternative donne des résultats positifs ou douteux avec les souches non cible, l'essai doit être répété en réalisant le protocole complet de la méthode alternative, et avec la méthode de référence.

B-2.4. Praticabilité

Ce critère constitue une exigence supplémentaire requise pour bénéficier de la marque AFNOR Validation, au-delà du référentiel de validation de la norme NF EN ISO 16140.

Une étude de praticabilité/adaptabilité comportant les 13 critères suivants est réalisée :

- mode de conditionnement ;
- volume des réactifs ;
- conditions de stockage des éléments (+ péremption) ;
- modalités d'utilisation après la 1^{re} utilisation ;
- équipement des locaux spécifiques nécessaires ;
- réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer ;
- durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode ;
- temps réel de manipulation et flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser ;
- délai d'obtention des résultats ;
- type de qualification de l'opérateur ;
- étapes communes avec la méthode de référence ;
- traçabilité éventuelle des résultats ;
- maintenance par le laboratoire.

L'ensemble des résultats bruts et de l'interprétation de ces données d'évaluation de la méthode alternative sont mentionnés dans le **rapport d'étude de validation** et évalués par le bureau technique de validation qui valide les résultats et autorise la poursuite de l'étude collaborative.

La validation finale de la méthode alternative est ensuite accordée par le bureau technique au vu des résultats de comparaison et des résultats de l'étude collaborative.

Le laboratoire expert rédige alors un document de synthèse reprenant les principaux paramètres de validation de la méthode et disponible auprès des utilisateurs. De son côté, l'AFNOR rédige une attestation de validation de la méthode accordée pour quatre ans et devant être diffusée par le fabricant auprès des utilisateurs.

Remarque du groupe de travail

La Marque AFNOR Validation définit, sur la base des normes NF V03-100 et NF EN ISO 16140, une méthodologie pour estimer les critères de performance d'une méthode, sans définir de valeur limite pour chaque critère. En présence d'un nombre élevé de déviations positives et de déviations négatives en proportions équivalentes, le test du chi2 ne permet pas de mettre en évidence une différence significative entre les deux méthodes. L'examen des tableaux de comparaison des performances des méthodes (Tableaux 4 et 5), montre que les performances des méthodes sont inégales. Il paraît donc souhaitable que des valeurs limites minimales concernant les critères de performance des méthodes alternatives à valider soient définies.

B-3. Principales méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* et *Enterobacter sakazakii* et critères de performance

On peut accéder aux attestations de validation et rapports de synthèse des méthodes alternatives validées par AFAQ AFNOR Certification sur les sites Internet suivants :

- <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-methodes-validees/enterobacteriace-ae.html>
- <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-methodes-validees/salmonella.html>

Lorsque les prélèvements d'environnement sont inclus dans la validation, ceci est indiqué.

Le tableau de l'annexe V présente les principales caractéristiques des différentes méthodes, normalisées ou validées à la date du 30 mars 2007, utilisées pour la recherche et/ou le dénombrement des *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* et *E. sakazakii*, présentées dans cette section.

B-3.1. Enterobacteriaceae

Trois méthodes sont utilisées pour la recherche et/ou le dénombrement des *Enterobacteriaceae* : les méthodes de référence, de routine normalisées AFNOR, et alternatives bénéficiant de la marque AFNOR Validation. Les points principaux les concernant sont détaillés ci-dessous.

Méthodes de Référence

Il s'agit de méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae*.

- **Norme NF ISO 21528 - partie 1.** Recherche et dénombrement à l'aide de la technique NPP avec pré-enrichissement (décembre 2004)

Le dénombrement est effectué par calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 37 °C (ou 30 °C) en milieu liquide. Cette méthode est pertinente lorsque :

- les micro-organismes recherchés nécessitent une revivification avant enrichissement ;
- le nombre cherché est supposé être compris entre 1 et 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à essai ;
- Recherche :
 - pré-enrichissement en bouillon EPT (37 °C/18 h),
 - enrichissement sélectif sur bouillon E.E. (37 °C/24 h),
 - isolement sur milieu gélosé VRBG (37 °C/24 h),
 - identification des colonies caractéristiques (tests glucose et oxydase) ;
- Dénombrement NPP :
 - ensemencement en bouillon EPT (3 tubes par dilution) (37 °C/18 h),
 - enrichissement sélectif sur bouillon E.E. (trois tubes par dilution) (37 °C/24 h),
 - isolement sur milieu gélosé VRBG (37 °C/24 h),
 - identification des colonies caractéristiques (tests glucose et oxydase).

- **Norme NF ISO 21528 - Partie 2.** Dénombrement par comptage des colonies (décembre 2004)

Dénombrement des entérobactéries par comptage des colonies à 30 °C - Méthode de routine. Le dénombrement est effectué par comptage des colonies après incubation à 37 °C (ou 30 °C) en milieu solide. Il est recommandé d'utiliser cette technique lorsque le nombre cherché est supposé être supérieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à essai.

- ensemencement en profondeur sur milieu gélosé VRBG (37 °C/24 h),
- identification des colonies caractéristiques (tests glucose et oxydase).

Commentaires : un groupe de travail ISO étudie les possibilités d'allègement de la méthode : la suppression du bouillon EE est envisagée, des problèmes de spécificité du test glucose oxydase pour la confirmation ont conduit à envisager son remplacement par un test sur milieu O/F. Ces modifications sont en cours d'évaluation par l'Afssa-Lerqap dans le cadre de ses activités de laboratoire communautaire de référence (LCR) du lait et produits laitiers.

Méthode de routine normalisée AFNOR NF Vo8-054 (février 1999)

Le principe est le suivant :

- ensemencement sur gélose VRBG (une boîte/dilution) (30 °C/24 h) ;
- dénombrement des entérobactéries par comptage des colonies à 30 °C.

Remarque : la différence par rapport à NF ISO 21528-2 est l'absence de confirmation des colonies caractéristiques.

Commentaires : cette méthode n'inclut pas d'étape de confirmation. La température de 30 °C correspond à une recherche de bactéries d'intérêt technologique ; la question se pose de son utilisation en tant que 1^{re} étape de contrôle avant recherche d'*E. sakazakii* ou de salmonelle.

Les méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des Entérobactéries (ISO 21528-1 ; ISO 21525-2 et NF Vo8-054) sont applicables à tous les produits alimentaires.

Méthodes alternatives bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION

Tests basés sur des milieux de culture

- **Test 3M™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae** (Validation 1997; 2^e reconduction 14/06/2005 - fin 10/09/2009)
L'utilisation validée est de 24 h ± 2 h d'incubation. La validation est accordée pour une utilisation à 30 °C, à 35 °C et à 37 °C, mais l'étude de validation a été réalisée à 37 °C uniquement.
Il s'agit d'une méthode de dénombrement des entérobactéries, à l'aide d'un milieu de culture prêt à l'emploi qui contient du VRBG, un agent gélifiant soluble dans l'eau froide et un indicateur au tétrazolium facilitant la lecture.
- **TEMPO EB BioMérieux** (validation : 15/12/2006 - fin 15/12/2010)
Méthode validée pour le dénombrement des entérobactéries dans les produits alimentaires et les aliments pour animaux. Ce système est automatisé. Le système comporte une phase d'ensemencement et dilution à partir d'un milieu de culture original et une phase de lecture de la fluorescence et d'interprétation basée sur la technique NPP.

B-3.2. Salmonella

Les méthodes de détection et de dénombrement des salmonelles dans les aliments étant très nombreuses, le groupe a choisi de se limiter à l'étude des caractéristiques des méthodes de référence et des méthodes alternatives bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION, mais de ne pas développer les méthodes non validées (à part quelques exceptions, pour des raisons précisées en fin de paragraphe).

Méthodes de référence

Elles comprennent classiquement 4 étapes successives : pré-enrichissement 16 à 20 h, enrichissement (24 h), isolement (24 h), confirmation (1 à 3 j).

- **NF EN ISO 6579** (décembre 2002)
Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp :
 - pré-enrichissement en bouillon EPT (37 °C/18 h);
 - enrichissements sur bouillon sélectifs (RVS 24 h à 41,5 °C et MKTTn 24 h à 37 °C);
 - isolement sur milieux gélosés sélectifs (XLD et un autre milieu au choix) (37 °C/24 h);
 - identification et confirmation des colonies caractéristiques.

Cette méthode est applicable à tous les produits alimentaires.

- **Pr NR EN ISO 6785 (FIL 93)** (mars 2007)
Lait et produits laitiers - Détection des salmonelles :
 - pré-enrichissement en bouillon EPT (37 °C/16-20 h);
 - enrichissement sur deux bouillons sélectifs (RVS 24 à 48 h à 41,5 °C et sélénite/cystine 24 h à 48 h à 37 °C);
 - isolement sur milieu gélosé sélectif GVB et un autre milieu gélosé sélectif au choix (37 °C/20 à 48 h);
identification et confirmation des colonies caractéristiques.

Commentaire : le milieu sélénite/cystine est toxique pour l'environnement, son utilisation devrait être limitée voire supprimée.

Cette méthode n'est pas applicable aux autres produits alimentaires.

- **Méthode AOAC (AOAC official method - Salmonella in dried milk products)**
 - pré-enrichissement en eau distillée supplémentée en vert brillant;
 - enrichissement sélectif;
 - enrichissement par mobilité sur MSRVR;
 - identification et confirmation des colonies.

Méthodes alternatives bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION

Ces tests sont basés sur différents principes selon la liste ci-dessous. Les informations suivantes sont mentionnées pour chaque méthode : la référence commerciale de la méthode, le fabricant ou le distributeur en France, la première date de validation, la date de la dernière reconduction réalisée et la fin de validité de la méthode nécessitant à nouveau une reconduction pour être validée.

Tests basés sur des milieux de culture

- Simple Method For *Salmonella* (SMS) : AES Chemunex (07/05/2004-fin07/05/2008) (validé pour les prélèvements d'environnement)
- Rapid *Salmonella* : Bio-Rad (09/12/2005 - fin 09/12/2009)

Tests immunologiques

- OXOID *Salmonella* Rapid Test : (30/05/1991- reconduction 11/12/2003 - fin 07/09/2007)

Tests immuno-enzymatiques

- RAPIDYME *Salmonella* : Bio Art SA (09/12/2005 - fin 09/12/2009)
- BIOLINE *Salmonella* Elisa⁽¹²⁾ Test SELECTA (enrichissement en 24 h) : (12/03/2004 - fin 12/03/2008)
- BIOLINE *Salmonella* Elisa Test OPTIMA (enrichissement en 40 h) : (12/03/2004 - fin 12/03/2008)
- VIDAS *Salmonella* (protocole simple voie) : BIOMERIEUX (18/09/2002-reconduction 15/09/2006 - fin 15/09/2010)
- VIDAS *Salmonella* (protocole double voie) : BIOMERIEUX (06/04/1994- reconduction 15/09/2006 - fin 09/06/2010)
- VIDAS ICS-SLM : BIOMERIEUX (23/03/1999 - reconduction 05/02/2003 - fin 23/03/2007 ; prolongation du droit d'usage jusqu'au 30/09/2007)
- VIDAS ICS-boîte : BIOMERIEUX (23/03/1999- reconduction 05/02/2003 - fin 23/03/2007 - prolongation du droit d'usage jusqu'au 30/09/2007)
- VIDAS Easy *Salmonella* : BIOMERIEUX (20/09/2005 - fin 20/09/2009) (validé pour les prélèvements d'environnement)
- Plate *Salmonella* Gold : RAISIO DIAGNOSTICS SAS (23/03/2001-reconduction 03/02/2005 - fin 03/02/2009) (validé pour les prélèvements d'environnement)
- Ultima *Salmonella* : Tecra International Pty Ltd (02/04/2003 - fin 12/10/2007)
- Unique *Salmonella* : Tecra International Pty Ltd (12/12/2003 - fin 12/12/2007)

Méthodes de détection par biologie moléculaire bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION

Test d'hybridation moléculaire

- Lumiprobe 24 *Salmonella* : EURALAM (29/11/2000- extension 07/03/2002 - reconduction 08/04/2005 - fin 29/11/2008)

Le test est basé sur une réaction d'hybridation de sondes nucléiques en phase solide. L'ARN ribosomal de la bactérie cible est libéré par lyse cellulaire et capturé par un oligonucléotide spécifique adsorbé sur un support. L'ARN ribosomal ainsi capturé est hybridé avec un deuxième oligonucléotide marqué qui permettra la révélation par une réaction de chemiluminescence.

Avant de réaliser le test, la méthode comprend un pré-enrichissement en bouillon original à 37 °C pendant 6 à 8 heures suivi d'un enrichissement dans ce même bouillon à 41,5 °C pendant 17 à 19 heures.

Tests utilisant la PCR⁽¹³⁾

Les trois méthodes suivantes utilisent le principe de la PCR temps réel par amplification génique d'une séquence nucléique spécifique de *Salmonella*. La détection se fait soit à l'aide d'un agent intercalant fluorescent (système BAX™ *Salmonella*), soit avec une sonde oligonucléique spécifique marquée par un fluorophore qui émet une fluorescence uniquement si l'hybridation avec les amplicons a lieu (les sondes sont respectivement de type Taqman pour GeneDiscCycler *Salmonella* et Molecular Beacons pour IQ-check *Salmonella*). Ces méthodes utilisent un contrôle interne d'inhibition permettant de vérifier l'absence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon :

(12) ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) : technique sérologique immunoenzymatique pour le dosage des anticorps.

(13) PCR (Polymerase Chain Reaction) : technique de détection de l'ADN par amplification en chaîne par polymérase.

- BAX™ *Salmonella*: QUALICON distribué par OXOID (28/11/2002- reconduction 23/10/2006- fin 28/11/2010), validé AOAC.
Les poudres de lait doivent être traitées selon le protocole général et non selon le protocole utilisé pour les produits laitiers.
- GeneDiscCycler *Salmonella*: GeneSystems (12/12/2003 - fin 12/12/2007)
- IQ-check *Salmonella* (BioRad) (01/07/2004 - fin 01/07/2008) (validé pour les prélèvements d'environnement)

Critères de performance des méthodes de détection de salmonelles dans les aliments bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION

Les principes généraux de validation de méthodes alternatives à l'AFAQ AFNOR Certification selon le référentiel NF EN ISO 16140 sont décrits dans la section B-2.

Les tableaux 4 et 5 regroupent les principales caractéristiques de performance des méthodes alternatives de détection des *Salmonella* actuellement validées. L'objectif de ces tableaux n'est pas de classer les méthodes les unes par rapport aux autres mais de rassembler de façon synthétique les principaux paramètres utilisés lors de cette validation. Cette synthèse n'existait pas jusqu'à présent.

Les données ont été extraites des dossiers de synthèse et/ou des certificats de validation de chacune des méthodes. Ces méthodes ont été évaluées par un laboratoire expert, accrédité pour la méthode de référence NF EN ISO 6579 relative à la détection des *Salmonella*. Ce laboratoire est habilité par l'AFAQ AFNOR Certification et désigné par le demandeur de la validation. Les critères de performance ont été évalués à partir de l'analyse d'échantillons artificiellement ou naturellement contaminés détenus par le laboratoire expert. Les contextes de validation de ces méthodes sont par conséquent différents. Néanmoins, ils ont tous suivi le même processus de validation, selon le référentiel NF EN ISO 16140 ou selon l'ancien référentiel Vo3-100.

Les méthodes certifiées par AAC ont été jugées globalement équivalentes à celles de la méthode de référence du fait de leurs performances. Le Bureau technique AAC choisit, par consensus, de recommander la validation de chaque méthode jugée individuellement en fonction d'une évaluation globale de tous les critères testés lors d'une étude préliminaire et d'une étude interlaboratoire.

Il faut souligner que les valeurs de sensibilité et spécificité des méthodes validées selon le référentiel NF Vo3-100 ont été calculées par le groupe d'experts, selon les formules affichées dans les tableaux 4 et 5.

Ceux-ci rassemblent les paramètres des différentes méthodes validées et doivent être interprétés avec prudence compte tenu des limites présentées ci-dessus. La connaissance complète du dossier de validation de chaque méthode est nécessaire avant d'en tirer des interprétations trop hâtives. Dans le cas d'une déviation positive, il est important d'identifier s'il s'agit d'un positif supplémentaire de la méthode alternative, confirmé par l'isolement de la souche, c'est-à-dire d'un faux négatif de référence ou d'un vrai positif. Toutes les déviations positives figurant dans les tableaux 4 et 5 correspondent à des vrais positifs.

Commentaires du tableau général des performances des méthodes alternatives sur l'ensemble des catégories de produits (tableau 4)

Pour les méthodes référencées, les valeurs d'exactitude varient de 93,9 % à 99,8 %.

La méthode Rapid'*Salmonella* présente une exactitude de 93,9 % avec la mise en évidence de 12 déviations négatives et de 13 déviations positives correspondant à des positifs confirmés par rapport à la méthode de référence. D'autres tests ont obtenu des déviations positives, il s'agit de l'OSRT (6), du SMS (3). Ces deux méthodes sont des tests associés à des géloses spécifiques d'isolement, par conséquent, ces déviations positives correspondent également à des vrais positifs puisque la souche a été isolée. Des tests fondés sur d'autres principes ont également identifié des déviations positives, il s'agit des méthodes Vidas Easy *Salmonella* (3), Vidas ICS-SLM (1), Vidas ICS-boîte (1), iQ-Check *Salmonella* (1), Lumiprobe 24 *Salmonella* (1), Système Bax *Salmonella* automatisé (1), Unique *Salmonella* (1) et Ultima *Salmonella* (1). Un nombre important de déviations négatives ont été mises en évidence notamment avec le test Rapid'*Salmonella* (12) et avec le test Bioline Selecta (8). Ces déviations négatives correspondent à des échantillons trouvés négatifs par la méthode alternative alors qu'ils ont été identifiés positifs par la méthode de référence avec isolement de la souche. Il s'agit souvent d'échantillons pour lesquels la méthode de référence a permis d'isoler des colonies à partir d'un seul des deux milieux d'enrichissement, ce milieu n'est pas forcément utilisé lors de l'application de la méthode alternative. Toutes les méthodes étudiées ont présenté au moins une déviation négative.

Les valeurs de sensibilité varient entre 93,3 % et 100 %. Les valeurs plus faibles peuvent être en partie dues à la réduction des temps d'incubation des milieux d'enrichissement qui, bien que préconisés par le fabricant, peuvent alors être insuffisants pour obtenir un nombre de cellules détectables par la méthode alternative. Les valeurs de spécificité varient de 94,3 % à 100 %.

Les variations dans les valeurs de la limite de détection sont probablement dues aux différences de protocoles d'étude et de calcul de cette limite de détection selon les deux référentiels (Vo3-100 et NF EN ISO 16140). On ne peut en conclure que les performances sont différentes.

Commentaires du tableau sur la catégorie « produits laitiers » (tableau 5)

Les exigences du référentiel NF EN ISO 16140 ont nécessité l'analyse de 60 échantillons appartenant à cette catégorie devant se répartir équitablement en échantillons positifs et négatifs. Les exigences n'étaient pas aussi strictes pour les validations antérieures selon le référentiel NF Vo3-100 et le nombre d'échantillons analysés était souvent inférieur à cette valeur.

Certaines méthodes ont montré une concordance parfaite dans cette catégorie avec la méthode de référence correspondant ainsi à 100 % d'exactitude, 100 % de sensibilité et de spécificité. Il s'agit de la méthode Tecra Unique *Salmonella*, de la méthode Transia Plate *Salmonella* Gold, du Vidas *Salmonella* double voie et du test Bioline Selecta (24 h). D'autres méthodes ont présenté aussi 100 % de spécificité mais avec parfois une ou deux déviations négatives, il s'agit de la méthode Tecra Ultima *Salmonella*, du Vidas SLM simple voie, du Vidas Easy *Salmonella*, du Gene-Disc Cycler, du test Optima de Bioline et du test Rapidyme *Salmonella*. Certains tests ont présenté 100 % de sensibilité mais avec une ou deux déviations positives, il s'agit du système BAX automatisé (validé pour les prélèvements d'environnement), du Vidas ICS-SLM, de l'OSRT, et de la méthode SMS, ces deux dernières méthodes étant fondées sur des milieux de culture. La plupart des valeurs d'exactitude varient de 96,7 % à 100 %. La méthode Rapid' *Salmonella* et le système Lumiprobe *Salmonella* présentent 90,3 % et 91,7 % d'exactitude respectivement. Il est à noter qu'il existe un protocole spécifique de la méthode Bax automatisé pour la catégorie produits laitiers, cependant les poudres de lait doivent être analysées avec le protocole général. Il existe d'autre part un protocole particulier de la méthode Vidas ICS-boîte adaptée à l'analyse des poudres de lait.

On notera que les essais réalisés avec les matrices « poudres » sont très minoritaires par rapport aux autres matrices, les résultats n'ont pas pu être exploités.

Méthodes alternatives ne bénéficiant pas de la marque AFNOR VALIDATION

Il existe un nombre très important de méthodes alternatives non validées, basées ou non sur la PCR. Dans l'impossibilité d'être exhaustif, le présent rapport ne développe pas cet aspect.

On notera toutefois que deux méthodes (PCR ELISA, PCR temps réel) basées sur l'amplification d'une séquence du gène *invA* spécifique des salmonelles ont été validées au cours d'essais multicentriques dans le cadre d'un programme européen Food-PCR et que leurs performances ont fait l'objet d'une publication scientifique (Perelle, Dilasser *et al.* 2004).

Enfin, l'expérience montre que les méthodes de référence horizontales ne sont pas toujours optimales pour certaines matrices particulières comme les poudres de lait. Dans un contexte d'épidémie, il peut être légitime d'adapter les méthodes, soit en augmentant le volume de la prise d'essai soit en modifiant le protocole, par exemple l'étape d'enrichissement. Pour illustration, une méthode interne non publiée (« méthode FIL modifiée » pour les poudres de lait avec un pré-enrichissement en eau distillée stérile supplémentée en vert brillant à 0,5 %) et dilution au 1/5^e, suivie de la procédure habituelle d'analyse avec la norme NF EN ISO 6579 ou selon une méthode certifiée AFNOR VALIDATION, a été utilisée par la DGCCRF et par le Lerqap lors de l'alerte *Salmonella* Agona.

B-3.3. *Enterobacter sakazakii*

Une évolution dans la taxonomie de l'espèce *E. sakazakii* est en cours⁽¹⁴⁾: *E. sakazakii* appelé « Enterobacter cloacae pigmenté en jaune » était divisé jusqu'à présent en 4 groupes phylogénétiques par l'analyse de l'ADNr 16S (Iversen, Lancashire *et al.* 2006). Les tests « indole », « dulcitol » et « inositol » permettaient de distinguer biochimiquement ces 4 groupes. L'application des méthodes d'hybridation ADN/ADN, de ribotypage et l'analyse AFLP a révélé qu'il existe plusieurs espèces distinctes. Une nouvelle classification comprenant un nouveau genre *Cronobacter* regroupant 4 espèces ou plus, avec toutes les souches identifiées comme *E. sakazakii* regroupées sous le nom *Cronobacter sakazakii* a été proposée (Iversen *et al.* 2007).

Pour *E. sakazakii*, contrairement aux salmonelles pour lesquelles de très nombreuses méthodes d'analyse ont été décrites, une seule méthode de référence est en cours de mise au point (il s'agit donc pour le moment d'une spécification technique, cf. Introduction). Un projet de norme ISO est en cours et les méthodes alternatives développées ne sont pas encore validées par AFAQ AFNOR Certification, ni par AOAC.

Méthodes de référence

• Spécification Technique⁽¹⁵⁾ ISO/TS 22964 FIL/RM 210 Lait et produits laitiers - Détection d'*Enterobacter sakazakii*

- pré-enrichissement en bouillon EPT (37 °C/18 h)
- enrichissement en bouillon sélectif (mLST + vancomycine) (44 °C/24 h)
- isolement sur milieu gélosé sélectif (ESIA) (44 °C/24 h)
- identification des colonies: coloration jaune sur milieu gélosé TSA (25 °C/24 - 48 h) et confirmation biochimique.

Cette méthode a été testée sur les produits déshydratés destinés aux nourrissons, sur des produits de l'environnement et sur souches pures.

Commentaires:

Un certain nombre d'aspects pourraient être améliorés en ce qui concerne le bouillon d'enrichissement. Le bouillon mLST vancomycine donne des performances médiocres: le lauryl sulfate détruit certaines souches d'*E. sakazakii*, la température d'incubation de 44 °C empêche la récupération des faibles nombres, le lactose n'est pas très spécifique. Il y a un manque de spécificité de la coloration jaune sur milieu gélosé TSA, si l'incubation se fait en l'absence de lumière. Ces commentaires sont pris en compte dans la révision de la spécification technique, en cours.

Différents milieux d'isolement sélectifs chromogènes ont été testés: DFI, ESIA, ESPM, DFI modifié et COMPASS *Enterobacter sakazakii* au cours de deux études successives menées par l'Afssa-Lerqap et quelques valeurs sont disponibles à l'heure actuelle sur les critères de performance de ces milieux (tableau 6). L'une des études portait sur des souches en culture pure (Besse, Leclercq *et al.* 2006), l'autre portait sur des échantillons naturellement contaminés (Derzelle, Dilasser *et al.* 2007).

(14) V. Lafarge (communication personnelle).

(15) Rappel: une spécification technique doit être révisée ou supprimée avant 3 ans.

Tableau 4: Tableau de synthèse des critères de performance des méthodes de détection de salmonelles dans les aliments validées AAC relativement à l'ensemble des échantillons testés (au 30 mars 2007)

Table 4: Summary table of the performance criteria of AAC-validated methods for detecting Salmonellae in foods with regard to all of the samples tested (as at 30 March 2007)

Référentiel de validation Validation reference standard	Société Company	Méthode Method	PA PA	NA NA	ND ND	PD PD	N No. of samples tested	Exactitude (PA+NA/N) Accuracy (PA+NA/N)	Sensibilité (PA/PA+ND) Sensitivity (PA/PA+ND)	Spécificité ((NA/NA+PD) Specificity (NA/NA+PD)	Limite de détection sur produit (bactéries/25 g) ⁽¹⁶⁾ Detection limit on product (bacterial/25g) ⁽¹⁶⁾	Concordance avec la méthode de référence Agreement with the reference method
NF V03-100	Bioline	Test Selecta (24 h)	141	222	2	0	365	99,5 %	95,1 %	100,0 %	5,0 – 9,0	=
NF V03-100	Bioline	Test Optima (40h)	173	222	8	0	365	98,0 %	95,6 %	100,0 %	5,0 – 9,0	=
NF V03-100	Biomérieux	Vidas ICS-SLM	90	108	2	1	201	98,5 %	97,8 %	99,1 %	2,0 – 6,0	=
NF V03-100	Biomérieux	Vidas ICS-boîte	89	108	3 ⁽¹⁷⁾	1	201	98,0 %	96,7 %	99,1 %	2,0 – 6,0	=
NF V03-100	GeneSystems	GeneDisc Cycloer Salmonella	132	141	3	0	276	98,9 %	97,8 %	100,0 %	2,0 – 9,0	=
NF V03-100	Oxoid	Oxoid Salmonella rapid test (OSRT)	135	180	1	6	322	97,8 %	99,1 %	96,6 %	2,0 – 10,0	=
NF V03-100	Tetra International Pty Ltd	Unique Salmonella	127	131	2	1	261	98,8 %	98,4 %	99,2 %	3,0 – 8,0	=
NF V03-100	Tetra International Pty Ltd	Ultima Salmonella	127	131	2	2	262	98,5 %	98,4 %	98,5 %	1,0 – 10,0	=
NF EN ISO 16140	AES Chemunex	Simple Method for Salmonella (SMS)	181	193	1	3	378	98,9 %	99,5 %	98,5 %	0,2 – 0,7	=
NF EN ISO 16140	Bio Art SA	Rapidyme Salmonella	162	172	2	1	337	99,1 %	98,8 %	99,4 %	0,1 – 2,6	=
NF EN ISO 16140	Biomérieux	Vidas Salmonella simple voie	150	176	2	0	328	99,4 %	98,7 %	100,0 %	0,3 – 1,7	0,3 – 1,4
NF EN ISO 16140	Biomérieux	Vidas Salmonella double voie	151	176	1	0	328	99,7 %	99,3 %	100,0 %	0,3 – 1,4	=
NF EN ISO 16140	Biomérieux	Vidas Easy Salmonella	159	192	5	3	359	97,8 %	97,0 %	98,5 %	0,3 – 2,2	=
NF EN ISO 16140	Bio-Rad	Rapid Salmonella	166	216	12	13	408	93,9 %	93,3 %	94,3 %	0,1 – 3,4	0,1 – 5,6
NF EN ISO 16140	Bio-Rad	iQ-Check Salmonella	188	237	2	1	428	99,3 %	98,9 %	99,6 %	0,3 – 2,2	=
NF EN ISO 16140	Europrobe SA	Lumiprobe 24 Salmonella	142	150	7	1	300	97,3 %	95,3 %	99,3 %	0,6 – 8,2	0,8 – 1,9
NF EN ISO 16140	Oxoid	System BAX Salmonella automatisé	186	232	6	1	425	98,4 %	96,9 %	99,6 %	0,2 – 1,0	=
NF EN ISO 16140	Raisio Diagnostics SAS	Transia Plate Salmonella Gold	186	242	1	0	429	99,8 %	99,5 %	100,0 %	0,2 – 1,5	=

⁽¹⁶⁾ Valeurs minimales et maximales obtenues à partir de l'intervalle de confiance de chaque matrice. / Minimum and maximum values obtained from the confidence interval of each matrix.

⁽¹⁷⁾ Isolement sur milieu XLD ou milieu GVB. / Isolation in XLD or GVB medium.

Tableau 5 : Tableau de synthèse des critères de performance des méthodes de détection de salmonelles dans les aliments validées AAC relativement aux échantillons des produits laitiers testés (au 30 mars 2007)

Table 5: Summary table of the performance criteria of AAC-validated methods for detecting Salmonellae in foods with regard to the samples of dairy products tested (as at 30 March 2007)

Référentiel de validation Validation reference standard	Société Company	Méthode Method	PA PA	NA NA	ND ND	PD PD	N No. of samples tested	Exactitude (PA+NA/N) Accuracy (PA+NA/N)	Sensibilité (PA/PA+ND) Sensitivity (PA/PA+ND)	Spécificité (NA/NA+PD) Specificity (NA/NA+PD)	Limite de détection sur produit (bactéries/25 g) ⁽¹⁸⁾ Detection limit on product (bacteria/25g) ⁽¹⁸⁾	Concordance avec la méthode de référence Agreement with the reference method
NF V03-100	Bioline	Test Selecta (24h)	33	32	0	0	65	100,0 %	100,0 %	100,0 %	7,0 – 8,0	=
NF V03-100	Bioline	Test Optima (40h)	32	32	1	0	65	98,5 %	97,0 %	100,0 %	7,0 – 8,0	=
NF V03-100	Biomérieux	Vidas ICS-SLM	19	22	0	1	42	97,6 %	100,0 %	95,7 %	2,0 – 6,0	=
NF V03-100	Biomérieux	Vidas ICS-boîte ⁽¹⁹⁾	18	22	1	1	42	95,2%	94,7%	95,6%	2,0 – 6,0	=
NF V03-100	GeneSystems	GeneDisc Cycler <i>Salmonella</i>	29	32	1	0	62	98,4 %	96,7 %	100,0 %	2,0 – 9,0	=
NF V03-100	Oxoid	Oxoid <i>Salmonella</i> rapid test (OSRT)	25	42	0	1	68	98,5 %	100,0 %	97,7 %		
NF V03-100	Tetra International Pty Ltd	Unique <i>Salmonella</i>	30	30	0	0	60	100,0 %	100,0 %	100,0 %	4,0 – 10,0	=
NF V03-100	Tetra International Pty Ltd	Ultima <i>Salmonella</i>	29	30	1	0	60	98,3 %	96,7 %	100,0 %	2,0 – 8,0	=
NF EN ISO 16140	AES Chemunex	Simple Method for <i>Salmonella</i> (SMS)	28	31	0	2	61	96,7 %	100,0 %	93,9 %	0,1 – 0,7	=
NF EN ISO 16140	Bio Art SA	Rapidyme <i>Salmonella</i>	32	31	2	0	65	96,9 %	94,1 %	100 %	0,4 – 2,6	0,3 – 1,9
NF EN ISO 16140	Biomérieux	Vidas <i>Salmonella</i> simple voie	29	36	1	0	66	98,5 %	96,7 %	100,0 %	0,5 – 1,7	0,4 - 1,1
NF EN ISO 16140	Biomérieux	Vidas <i>Salmonella</i> double voie	30	36	0	0	66	100,0 %	100,0 %	100,0 %	0,4 – 1,1	=
NF EN ISO 16140	Biomérieux	Vidas Easy <i>Salmonella</i>	31	38	1	0	70	98,6 %	96,9 %	100,0 %	0,3 – 1,3	=
NF EN ISO 16140	Bio-Rad	Rapid <i>Salmonella</i> (24 h)	26	30	2	4	62	90,3 %	92,9 %	88,2 %	0,1 – 2,6	0,6 - 5,6
NF EN ISO 16140	Bio-Rad	Rapid <i>Salmonella</i> (8 h)	24	32	4	2	62	90,3 %	85,7 %	94,1 %	0,6 – 5,6	=
NF EN ISO 16140	Bio-Rad	iQ-Check <i>Salmonella</i>	36	32	1	1	70	97,1 %	97,3 %	97,0 %	0,3 – 0,7	0,4 – 0,8
NF EN ISO 16140	Europrobe SA	Lumiprobe 24 <i>Salmonella</i>	25	30	4	1	60	91,7 %	86,2 %	96,8 %	5,6 – 12,0	1,1 – 3,4
NF EN ISO 16140	Oxoid	System BAX <i>Salmonella</i> automatisé	31	33	0	1	65	98,5 %	100,0 %	97,1 %	0,3 – 1,0	=
NF EN ISO 16140	Raisio Diagnostics SAS	Transia Plate <i>Salmonella</i> Gold	35	30	0	0	65	100,0 %	100,0 %	100,0 %	0,4 – 1,4	=

(18) Valeurs minimales et maximales obtenues à partir de l'intervalle de confiance de chaque matrice. / Minimum and maximum values obtained from the confidence interval of each matrix.

(19) Résultats avec milieu XLD. Protocole particulier pour les poudres de lait (enrichissement dans 225 ml d'eau stérile + 0,45 ml de solution de vert-brillant à 1 %). / Results with XLD medium. Specific protocol for powdered milk (fortification in 225ml of sterile water + 0.45 ml of brilliant green solution at 1%).

Tableau 6 : Comparaison des critères de performance de différents milieux d'isolement sélectifs pour *E. sakazakii*

Table 6: Comparison of the performance criteria of different selective isolation media for E. sakazakii

Référence <i>Reference</i>		Milieu gélosé ESIA <i>ESIA agar medium</i>	Milieu gélosé DFI <i>DFI agar medium</i>	Milieu gélosé COMPASS <i>E. sakazakii</i> <i>E. sakazakii COMPASS agar medium</i>	Milieu gélosé VRBG <i>VRBG agar medium</i>
(Besse, Leclercq <i>et al.</i> 2006)	Souches en culture pure (28 souches <i>E. sakazakii</i> et 16 autres souches d'<i>Enterobacteriaceae</i>) <i>Strains in pure culture (28 E. sakazakii strains and 16 other Enterobacteriaceae strains)</i>				
Valeurs présomptives du milieu / <i>Presumptive values of the medium</i>					
	Sensibilité <i>Sensitivity</i>	92,8 %	85,7 %	Non testé <i>Not tested</i>	100 %
	Spécificité <i>Specificity</i>	93,7 %	100 %	Non testé <i>Not tested</i>	50 %
	PPV <i>PPV</i>	96,3 %	97 %	Non testé <i>Not tested</i>	80 %
	NPV <i>NPV</i>	88,2 %	78,8 %	Non testé <i>Not tested</i>	100 %
Valeurs présomptives de la méthode / <i>Presumptive values of the method</i>					
	Sensibilité <i>Sensitivity</i>	78,6 %	75 %	Non testé <i>Not tested</i>	78,6 %
	Spécificité <i>Specificity</i>	100 %	100 %	Non testé <i>Not tested</i>	93,7 %
	PPV / <i>PPV</i>	100 %	100 %	Non testé <i>Not tested</i>	96,5 %
	NPV / <i>NPV</i>	72,7 %	69,6 %	Non testé <i>Not tested</i>	71,4 %
(Derzelle, Dilasser <i>et al.</i> 2007)	Échantillons naturellement contaminés (38 échantillons) <i>Naturally contaminated samples (38 samples)</i>				
Valeurs présomptives du milieu / <i>Presumptive values of the medium</i>					
	PPV / <i>PPV</i>	87 %	74 %	88 %	48 %
	NPV / <i>NPV</i>	100 %	100 %	100 %	67 %
Valeurs présomptives de la méthode / <i>Presumptive values of the method</i>					
	Sensibilité <i>Sensitivity</i>	100 %	100 %	100 %	69 %
	Spécificité <i>Specificity</i>	83 %	61 %	81 %	45 %

Sensibilité (%) = vrais positifs/(vrais positifs + faux négatifs) x 100.

Spécificité (%) = vrais négatifs/(vrais négatifs + faux positifs) x 100.

Valeur prédictive positive (PPV %) = vrais positifs/(vrais positifs + faux positifs) x 100.

Valeur prédictive négative (NPV %) = vrais négatifs/(vrais négatifs + faux négatifs) x 100.

Sensitivity (%) = true positives/(true positives + false negatives) x 100.

Specificity (%) = true negatives/(true negatives + false positives) x 100.

Positive predictive value (PPV %) = true positives/(true positives + false positives) x 100.

Negative predictive value (NPV %) = true negatives/(true negatives + false negatives) x 100.

La limite de détection testée pour 3 souches d'*E. sakazakii* à trois niveaux de contamination allant de 5 bactéries/100 g à 50 bactéries/25 g, et en l'absence de contamination (Besse, Leclercq *et al.* 2006) donne des résultats similaires pour les milieux d'isolement testés. Les limites de détection obtenues sont inférieures à 10 bactéries/100 g, la plus basse étant de 4,3 bactéries/100 g.

• **Projet de Norme ISO applicable à l'ensemble des denrées alimentaires : en préparation (ISO/TC 34/SC 9)**

Le projet a pour objectifs d'améliorer l'ISO/TS 22964 et d'en étendre le champ d'application aux aliments susceptibles de présenter un risque résultant de la présence d'*E. sakazakii*. Il devrait être applicable aux ingrédients tels que lécithine de soja ou amidon modifié ainsi qu'aux échantillons de l'environnement.

Commentaires : une étude comparative sur différents bouillons d'enrichissement sélectif et différents milieux d'isolement sélectifs chromogènes sera réalisée dans sept laboratoires.

• **Méthode FDA**

- pré-enrichissement eau désionisée (37 °C/22-24 h);
- enrichissement en bouillon E.E. (37 °C/20-24 h);
- isolement sur milieu gélosé sélectif (VRBG) (37 °C/20-24 h);
- isolement sur milieu gélosé TSA (coloration jaune des colonies à 25 °C/24-72 h en présence de lumière);
- confirmation biochimique.

Cette méthode a été testée sur produits alimentaires déshydratés, ingrédients alimentaires, produits de l'environnement et sur souches pures. Quelques valeurs sur les critères de performance sont également disponibles (Iversen, Druggan *et al.* 2004; Restaino, Frampton *et al.* 2006).

Tableau 7: Comparaison des critères de performance de méthodes de détection pour *E. sakazakii*

Table 7: Comparison of the performance criteria of E. sakazakii detection methods

Référence / Reference			
(Iversen, Druggan <i>et al.</i> 2004)	Souches en culture pure (95 souches <i>E. sakazakii</i> et 148 autres souches entérobactéries) <i>Strains in pure culture (95 E. sakazakii strains and 148 other enterobacteria strains)</i>		
Valeurs présomptives de la méthode / Presumptive values of the method			
		Milieu gélosé DFI <i>DFI agar medium</i>	Méthode FDA <i>FDA method</i>
	Sensibilité / <i>Sensitivity</i>	100 %	83,3 %
	Spécificité / <i>Specificity</i>	87,2 %	100 %
(Restaino, Frampton <i>et al.</i> 2006)	Échantillons naturellement contaminés (240 échantillons) <i>Naturally contaminated samples (240 samples)</i>		
Valeurs présomptives de la méthode / Presumptive values of the method			
		Milieu gélosé ESPM <i>ESPM agar medium</i>	Milieu gélosé VRBG <i>VRBG agar medium</i>
	Sensibilité / <i>Sensitivity</i>	100 %	59,3 %
	Spécificité / <i>Specificity</i>	96,9 %	43,7 %

Méthodes alternatives

L'ensemble des méthodes d'analyse alternatives pour la détection d'*E. sakazakii* est recensé ci-après. Il s'agit de méthodes commercialisées ou non, de microbiologie classique ou de biologie moléculaire (PCR conventionnelle ou en temps réel, hybridation).

Méthodes commercialisées de détection par biologie moléculaire

• **Kit Bax[®] *Enterobacter sakazakii* (Oxoid) non certifié AFNOR VALIDATION**

La méthode est basée sur la technique de PCR en temps réel. La trousse a été testée sur des préparations déshydratées pour nourrissons, poudres de lait infantile, poudres de soja. Elle est également testée dans une étude menée à l'heure actuelle au Lerqap.

• **Test commercial VIT (Vermicon identification technology)**

Le test est basé sur l'hybridation *in situ* d'ARN 16S (sondes fluorescentes et visualisation sous microscope à épifluorescence). Cette trousse a été testée sur souches (Lehner, Nitzsche *et al.* 2006), une autofluorescence a été observée pour quelques souches non *E. sakazakii*. L'ajout d'une souche *E. sakazakii* comme témoin positif permet de distinguer ces faux positifs par différentiel de luminosité.

D'autres méthodes ont été publiées mais non commercialisées. En voici une liste qui ne prétend pas à l'exhaustivité.

Méthodes bactériologiques publiées à la date du 30 mars 2007

• **(Kandhai, Reij *et al.* 2004)**

- pré-enrichissement en bouillon EPT (37 °C/18-20 h);
- isolement sur milieu gélosé VRBL (37 °C/20-24 h);
- isolement des colonies typiques de coliformes sur milieu gélosé TSA (37 °C/24 h ou 25 °C/48 h);
- identification des colonies jaunes sur milieu gélosé TSA par les tests oxydase, α -glucosidase et confirmation biochimique.

Cette méthode a été testée sur des échantillons de l'environnement (usine de production de poudre de lait)

Commentaires: la combinaison de l'aspect des colonies pigmentées en jaune sur milieu gélosé TSA et de la présence de l'activité α -glucosidase est suffisante pour différencier *E. sakazakii* des autres coliformes. Ce point a été pris en compte pour la révision de la norme, en cours.

• **(Guillaume-Gentil, Sonnard *et al.* 2005)**

- pré-enrichissement en bouillon EPT (37 °C/16-20 h) (cette étape n'est pas nécessaire);
- isolement sur bouillon sélectif (mLST + vancomycine) (45 °C/22-24 h);
- isolement sur milieu gélosé TSA supplémenté en sels biliaires (37 °C/24 h en présence de lumière);
- identification des colonies jaunes sur milieu gélosé TSA par le test α -glucosidase et confirmation biochimique.

Cette méthode a été testée sur des échantillons de l'environnement (usine de production de poudre de lait).

Commentaires: l'enrichissement en bouillon sélectif mLST + vancomycine suivi d'un isolement sur milieu gélosé TSA supplémenté en sels biliaires augmente le nombre d'échantillons positifs par rapport à la méthode décrite par Kandhai *et al.* (2004).

Méthodes utilisant la PCR conventionnelle publiées à la date du 30 mars 2007

• **(Lehner, Tasara *et al.* 2004)**

- cible « 16S rRNA » sans contrôle interne (CI)
- méthode testée sur souches

• **(Lehner, Riedel *et al.* 2006)**

- cible « α -glucosidase » sans CI
- méthode testée sur souches

• **(Nair and Venkitanarayanan 2006)**

- cible « ompA » avec CI
- méthode testée sur poudres de lait infantile et sur souches

- **(Lafarge, Ogier et al. 2004)**

- méthode TTGE/DGGE;
- méthode testée sur laits et fromages mais pas encore sur des poudres de lait.

Méthodes utilisant la PCR temps réel publiées à la date du 30 mars 2007

- **(Seo and Brackett 2005)**

- cible « rpsU-dnaG » sans CI;
- méthode testée sur produits déshydratés destinés aux nourrissons (lait, soja, céréales) et sur souches.

- **(Liu, Gao et al. 2006)**

- cible « 16S-23S ITS sequence » avec CI;
- méthode testée sur poudres de lait infantile et sur souches.

- **(Malorny and Wagner 2005)**

- cible « 16S RNA » avec CI;
- méthode testée sur souches (pour 4 souches d'*E. sakazakii* sur 27, un résultat de Ct compris entre 29 et 32 au lieu de 14-18 pour les autres souches).

- **(Derzelle and Dilasser 2006)**

- cible « 16S-23S ITS sequence » avec CI;
- méthode testée sur les produits déshydratés destinés aux nourrissons, produits déshydratés de l'environnement de production et sur souches. Méthode PCR interne (Afssa-Lerqap, unité HMPA).

Autre méthode publiée à la date du 30 mars 2007

- **(Mullane, Murray et al. 2006)**

- capture sur billes magnétiques cationiques (Pathatrix) et croissance sur milieu gélosé sélectif
- méthode testée sur poudres de lait infantile.

B-4. Pertinence des résultats d'analyse obtenus par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR

L'objectif est ici d'évaluer la pertinence des résultats obtenus par PCR, de discuter les hypothèses pouvant être émises et l'interprétation qui peut en être donnée, lorsqu'une discordance est observée entre les résultats obtenus par une méthode classique et ceux obtenus par une méthode PCR.

B-4.1. Éléments nécessaires à la compréhension des résultats obtenus par PCR

Mise au point en 1985 par K. Mullis, la PCR a ouvert de nouvelles voies pour la détection et l'identification de micro-organismes pathogènes dans les domaines du diagnostic médical et de l'agroalimentaire. Cette technique permet d'amplifier une séquence d'acide nucléique donnée en un nombre très élevé de copies. Elle comporte plusieurs cycles d'amplification qui comprennent chacun trois étapes distinctes (dénaturation, hybridation, élongation). À la fin de chaque cycle, la quantité d'ADN cible est doublée, l'amplification est donc exponentielle: n cycles permettent l'obtention théorique de 2^n copies (si l'efficacité de la réaction était de 100 %, 30 cycles d'amplification permettraient d'obtenir 230 soit plus de 10^9 copies à partir d'une copie d'ADN).

Différentes techniques de révélation des produits d'amplification peuvent être utilisées. La plus ancienne et la plus simple est la révélation par le bromure d'éthidium (BET) après migration électrophorétique sur gel d'agarose et exposition aux ultraviolets. Mais cette méthode a plusieurs inconvénients: (i) l'utilisation de bromure d'éthidium (agent intercalant/cancérogène), (ii) la nécessité de confirmer l'identité du produit de PCR soit par hybridation avec une sonde marquée par Southern blot, soit par analyse du polymorphisme de restriction, soit par séquençage, (iii) le fait d'être peu adaptée aux grandes séries.

Ces inconvénients peuvent être évités par les méthodes de détection utilisant l'hybridation en phase solide ou en phase liquide, et une détection colorimétrique grâce à des techniques ELISA par exemple.

Plus récemment, un progrès considérable a été réalisé avec la PCR en temps réel: dans ce cas la réaction d'amplification de la séquence d'ADN cible suit les mêmes étapes qu'une PCR classique, mais repose sur le suivi, cycle par cycle, de la réaction au moyen d'une molécule fluorescente capable d'émettre un rayonnement proportionnel à la quantité d'ADN amplifié. La molécule fluorescente peut être un agent intercalant, le SYBR® Green IER™, des sondes fluorogéniques (sondes LightCycler®, sondes d'hydrolyse Taqman®, sondes Molecular

Beacons®, etc.). Une courbe d'intensité de fluorescence cycle après cycle est tracée : le cycle seuil (Ct : cycle threshold ou Cp : crossing point) correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence dépasse le bruit de fond du détecteur de fluorescence. Le Ct est d'autant plus faible que la quantité de séquences cibles engagées dans la réaction de PCR est élevée, ce qui permet d'évaluer la quantité initiale d'ADN : la PCR en temps réel est aussi appelée PCR quantitative. Les avantages principaux de cette technique sont nombreux : rapidité de réalisation, amélioration de la limite de détection, quantification possible de l'ADN mais également diminution des risques de contamination.

Il existe de nombreuses variantes de la technique PCR : citons par exemple la PCR multiplex qui permet de détecter plusieurs cibles dans une même réaction, et la PCR « nichée ou emboîtée » (ou nested PCR) qui associe deux PCR successives, la deuxième amplification faisant intervenir un couple d'amorces internes au premier fragment amplifié, ce qui améliore la spécificité. La RT-PCR⁽²⁰⁾ permet l'amplification de séquences d'ARN en utilisant une transcriptase inverse transformant l'ARN simple brin en ADN copie, ensuite amplifié par PCR.

La technique PCR présente cependant des inconvénients :

- le choix des cibles, des amorces, des conditions de la réaction (température d'hybridation, concentration en MgCl₂, etc.) a une influence considérable sur l'efficacité de la réaction ;
- les difficultés d'extraction de l'ADN dans certaines matrices peuvent être limitantes ;
- la possibilité de faux-négatifs dus à la présence d'inhibiteurs (héparine, hémoglobine, protéases, agents chélateurs du magnésium, sels, etc.) très fréquents dans les prélèvements biologiques ou dans les matrices alimentaires. Différentes techniques ont été développées pour lever ces inhibitions, mais un contrôle interne est indispensable pour contrôler l'absence d'inhibiteur dans chaque réaction ;
- la possibilité de faux positifs liés à une contamination de l'échantillon par de l'ADN exogène : des conditions de manipulations strictes sont absolument indispensables.

La nécessité d'une phase d'enrichissement préalable à la détection par PCR a été discutée pour la recherche des bactéries dans les matrices alimentaires : la limite de détection de la PCR directe sur l'aliment ne serait que de 10² à 10³ cellules/g et la technique aurait l'inconvénient de permettre la détection de bactéries stressées ou mortes, présentes en quantité importante. La phase d'enrichissement a deux avantages : la multiplication des bactéries les amène à un nombre où elles deviennent détectables et elle favorise la détection des bactéries vivantes, même si elle augmente également le temps nécessaire à l'analyse.

B-4.2. Interprétation de résultats ne concordant pas avec les résultats obtenus par les méthodes classiques

Lorsque des discordances sont observées entre les résultats obtenus par une méthode PCR et ceux obtenus par une méthode classique, plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- en cas de résultats négatifs par PCR/positifs par d'autres méthodes, il faudra s'interroger sur la qualité et l'efficacité des méthodes d'extraction des acides nucléiques, et s'assurer de la présence - dans chaque réaction - d'un contrôle interne permettant de vérifier l'absence d'inhibiteurs ;
- en cas de résultats positifs par PCR/négatifs par d'autres méthodes, les hypothèses envisagées sont : (i) la PCR permet dans certains cas de détecter des bactéries vivantes en quantité trop faible dans l'échantillon pour être détectées par les méthodes utilisant la culture (ii) elle permet de détecter des bactéries mortes ou stressées incapables de se multiplier donc d'être détectées par les méthodes conventionnelles avec culture (iii) il s'agit de faux positifs.

Nous considérerons uniquement le deuxième cas dans ce rapport (PCR positive). La première hypothèse ne sera pas discutée, on est alors en présence d'un vrai positif (i), et le logigramme présenté ci-après (Figure 3) présente une aide à l'interprétation d'un tel résultat. Ce logigramme peut être utilisé comme aide à la décision dans un contexte épidémique pour interpréter des résultats relatifs à un lot (en tenant compte du contexte de production), ou bien par un exploitant par exemple pour le contrôle libératoire des lots. Les deux autres hypothèses (ii) et (iii) sont discutées ci-dessous.

(20) RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) : technique de détection d'ARN messenger, utilisée pour estimer la viabilité d'un organisme (ce que ne permet pas la PCR faite sur l'ADN).

PCR et discrimination des bactéries mortes et des bactéries vivantes

Les méthodes de PCR peuvent permettre la détection de bactéries mortes ou stressées, endommagées par le processus de fabrication et les conditions de stockage des poudres de lait, et incapables de se multiplier.

En cas de résultat discordant entre la méthode basée sur la PCR (résultat positif) et les données obtenues par ailleurs, une solution pourrait être de réaliser une PCR directe sur l'aliment sans enrichissement (à partir de la suspension initiale de l'échantillon, avant incubation). Si un résultat positif est également obtenu, la présence de nombreuses bactéries mortes dans l'aliment peut être suspectée. Si un résultat négatif est obtenu, la présence de bactéries vivantes, en faible concentration dans l'aliment pourra être privilégiée.

Cependant, aucune méthode, que ce soit avec ou sans enrichissement préalable, n'a pour l'instant pu permettre de s'affranchir des problèmes d'extraction d'ADN, d'inhibition ou de détection des cellules mortes (Yang *et al.* 2003), surtout lorsque la mort cellulaire n'est pas obtenue par un processus dégradant fortement et rapidement le matériel nucléaire. Récemment, Rudi et collaborateurs ont proposé une méthode (EMA PCR) permettant de discriminer les cellules viables des cellules mortes (Rudi *et al.* 2005). Le monoazoture d'éthidium est utilisé pour pénétrer les cellules mortes, se lier de façon covalente à l'ADN et empêcher leur amplification. Cette publication constitue une avancée dans la détection plus spécifique de bactéries viables par l'adaptation aux procaryotes d'une technique largement utilisée chez les eucaryotes. Il est à noter que ce travail n'aborde pas les cellules viables mais non cultivables ou VNC.

La Reverse Transcription PCR est présentée comme la technique de pointe pour mettre en évidence des cellules vivantes du fait que la méthode cible une molécule dont la durée de vie est courte et dont la présence semble un excellent indicateur de viabilité, comparativement à d'autres. À notre connaissance, du fait de l'impossibilité actuelle d'obtenir des « lots » de cellules VNC, il n'y a pas d'informations disponibles sur la réponse des cellules VNC, telles que décrites par Federighi (2004) (Federighi 2004), à ce test. Il est vraisemblable, bien que cela reste à démontrer, que les cellules VNC (au ralenti ou dans le coma) ne répondent pas à ce test ou alors avec des signaux très faibles.

Figure 3 : Logigramme d'interprétations d'un résultat positif obtenu par PCR

Ce logigramme peut être utilisé comme aide à la décision dans un contexte épidémique pour interpréter des résultats relatifs à un lot (en tenant compte du contexte de production), ou bien par un exploitant par exemple avant le contrôle libératoire des lots.

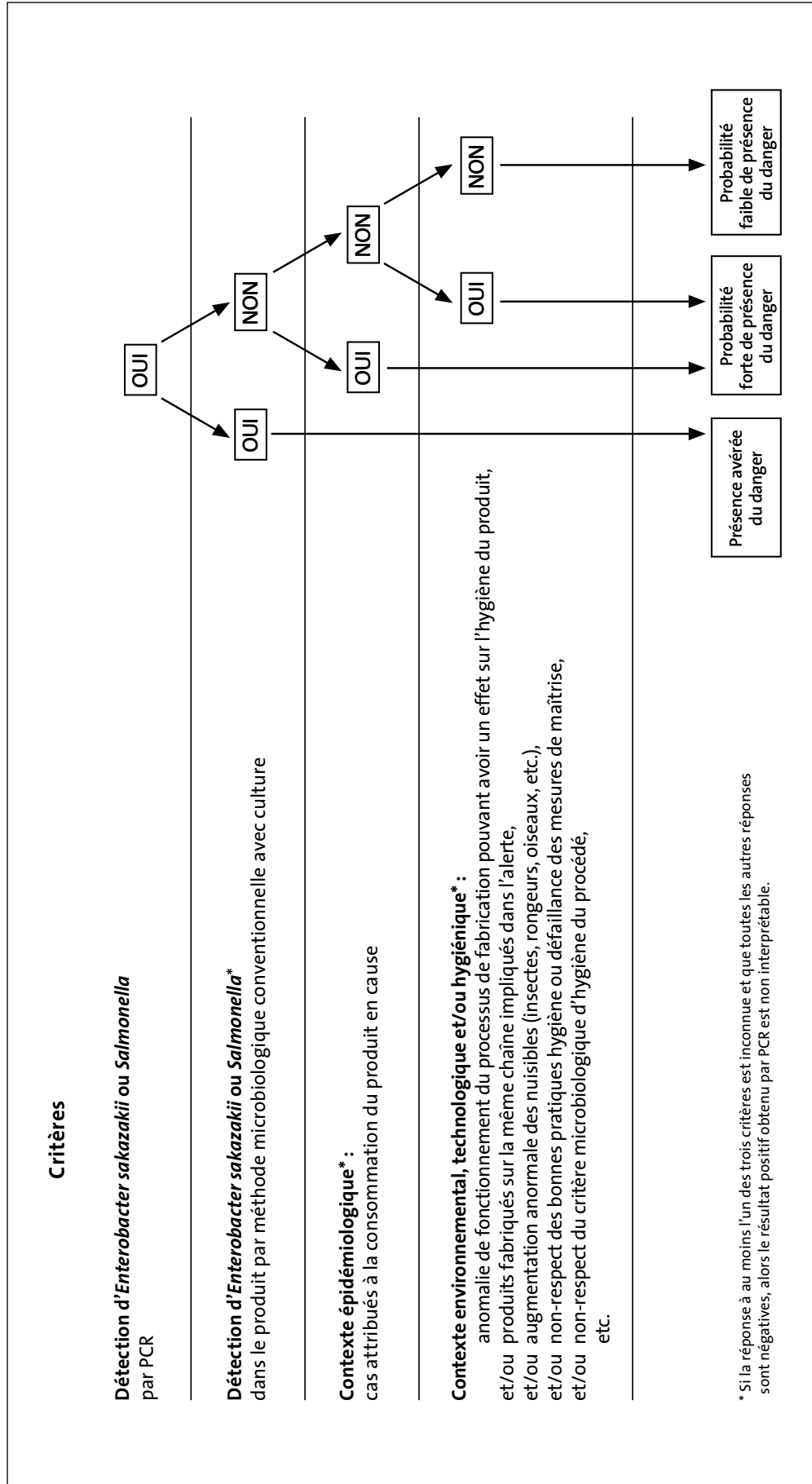


Figure 3: Logical diagram interpreting a positive result obtained by PCR

This logical diagram may be used to aid decision-making in an epidemic context to interpret the results of a batch (by taking the production context into account), or by an operator before conducting the green-light inspection of the batches for example.

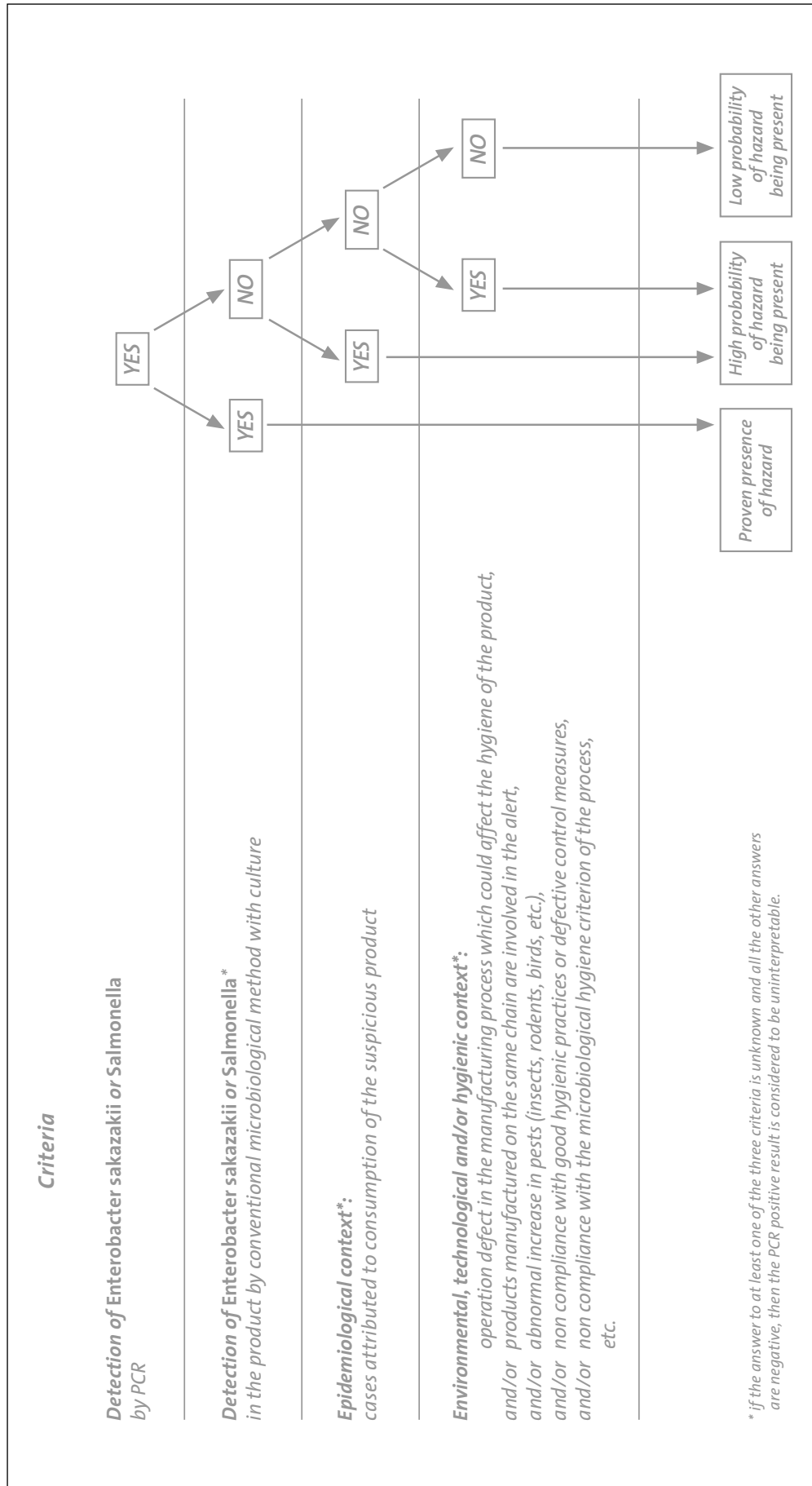


Tableau 8 : Distinction possible entre les états physiologiques des cellules en fonction de la méthode PCR utilisée

Table 8: Possible distinction between the physiological states of cells depending on the PCR method used

Le tableau présente les possibilités de mise en évidence des différentes sous-populations constitutives d'une population bactérienne par trois techniques de PCR. Comparativement à la PCR classique, et dans la mesure où les cellules mortes ne sont pas ciblées, les deux autres méthodes peuvent être considérées comme meilleures pour détecter et/ou quantifier les cellules viables. Toutefois, ces méthodes ne sont pas validées.

État physiologique des cellules <i>Physiological state of cells</i>	PCR classique <i>Conventional PCR</i>	EMA PCR <i>EMA PCR</i>	Reverse Transcription-PCR <i>Reverse Transcription-PCR</i>
Viables et cultivables sans revivification <i>Viable and culturable without revivification</i>	Oui <i>Yes</i>	Oui <i>Yes</i>	Oui <i>Yes</i>
Viables et cultivables après revivification <i>Viable and culturable after revivification</i>	Oui <i>Yes</i>	Oui <i>Yes</i>	Oui <i>Yes</i>
Viables mais non cultivables* <i>Viable but not culturable*</i>	Oui <i>Yes</i>	?	?
Mortes <i>Dead</i>	Oui <i>Yes</i>	Non** <i>No</i>	Non <i>No</i>

* Viable mais non cultivable (VNC) : incapable de se multiplier de façon visible dans ou sur un milieu normalement apte à la culture, même après revivification, mais manifestant une activité métabolique résiduelle, et dont la possibilité de se multiplier un petit nombre de fois n'est pas exclue.

** Cellules tuées par la chaleur.

* *Viable but not culturable (VNC): not able to multiply visibly in or on a medium that is usually suitable for culture, even after revivification, but manifesting a residual metabolic activity, and for which the possibility of multiplying a few times is not excluded.*

** *Cells killed by heat.*

PCR et faux positifs

Pour éviter les faux positifs, il est indispensable de vérifier les caractéristiques de la méthode PCR utilisée et la validité des résultats à l'aide des contrôles adéquats (cf. liste ci-après).

Une étude récente, réalisée au Lerqap utilisant le protocole décrit par Pérelle *et al.* (2004), a permis d'envisager des explications plausibles concernant l'écart important de positivité apparu précédemment entre les résultats obtenus par PCR et par les méthodes conventionnelles dans le cas de l'alerte *Salmonella* Agona : une bonne partie de ces résultats positifs était de faux positifs dus à des contaminations fortuites des échantillons au laboratoire (S. Derzelle, communication personnelle). Les conclusions de cette étude insistent, en cas d'utilisation de la PCR en temps réel, sur l'importance de vérifier l'allure de la courbe d'amplification et d'interpréter avec beaucoup de prudence des résultats positifs avec des valeurs de Ct élevées (de l'ordre de 30). L'expérience du Lerqap montre que de nombreux résultats faussement positifs présentaient de Ct supérieurs à 30.

Liste des caractéristiques de la méthode PCR et validité des résultats :

- expertise du laboratoire (accréditation) ;
- références bibliographiques, voire normatives de la méthode PCR ;
- matrice alimentaire (présence d'inhibiteurs ?) ;
- quantité de prises d'essai ;
- avec/sans enrichissement (si avec : milieu utilisé, température et durée d'incubation) ;
- méthode d'extraction des acides nucléiques ;
- PCR classique/PCR en temps réel ;
- nombre de cycles ;
- séquences des amorces et éventuellement de la sonde ;
- températures d'hybridation et concentration en MgCl₂ ;

- principe de la méthode de détection ;
- méthode de confirmation (séquençage du produit d'amplification, ELISA, hybridation) ;
- nature des témoins positifs et négatifs et résultats du contrôle interne ;
- contexte analytique : identification des prélèvements (numéro de lot, date et lieu du prélèvement), nombre de prélèvements effectués (nombre de répétitions), nombre de résultats positifs et négatifs ;
- proportion d'échantillons analysés ;
- traçabilité.

En tout état de cause, chaque fois qu'une méthode classique par culture est disponible, elle doit être utilisée pour confirmer les résultats obtenus par PCR.

Logigramme (Figure 3)

Le logigramme présente les interprétations possibles d'un résultat PCR obtenu dans un contexte épidémique. Il a été défini pour résoudre les difficultés d'interprétation de résultats positifs par les méthodes PCR et négatifs par les méthodes conventionnelles. Il est proposé pour aider le gestionnaire du risque dans le cas d'une alerte sanitaire. Bien qu'il n'ait pas été conçu pour cela, il peut être utilisé par un exploitant par exemple pour le contrôle libératoire des lots.

B-4.3. Conclusion

Aujourd'hui, les méthodes moléculaires, en particulier la PCR, méthode spécifique, rapide et sensible, sont de plus en plus utilisées pour la détection et l'identification des pathogènes alimentaires. L'utilisation de la PCR directement sur la matrice alimentaire permet un gain de temps considérable par rapport aux méthodes traditionnelles, mais présente des limites non négligeables : présence d'inhibiteurs de la réaction, difficultés et rendement de l'extraction d'ADN. Une PCR réalisée après enrichissement permet de contourner ces problèmes, mais le gain de temps est alors faible. Celle réalisée sur colonies ne permet pas non plus de gain de temps, mais augmente la spécificité de l'identification. La PCR quantitative, dite aussi en temps réel, peut également être envisagée pour une détermination rapide des niveaux de contamination des aliments. Cependant, il est indispensable de s'entourer de précautions et de nombreux contrôles pour éviter les mauvaises interprétations et les contaminations (cf. la norme AFNOR NF EN ISO 22174). Le logigramme proposé par les membres du groupe de travail se veut un outil concret pour aider le gestionnaire du risque dans le cas d'une alerte sanitaire.

Synopsis

À l'aide de simulations numériques, fondées sur un ensemble d'hypothèses de la répartition des bactéries dans la production de poudre de lait, différentes stratégies d'échantillonnage sont évaluées. Quatre caractérisations du processus de contrôle, considérées dans le présent rapport comme indépendantes, sont distinguées : (1) la production, (2) la contamination, (3) les prélèvements de poudre, (4) les analyses microbiologiques. Faut de disposer d'une idée réaliste de la perte de sensibilité qu'entraîne l'analyse microbiologique d'une plus grande quantité de poudre, nous n'avons pas pu apprécier correctement les mérites éventuels des pratiques courantes de regroupement de prélèvements ou de prises d'essai (dites de poolage).

La principale conclusion des résultats obtenus est qu'il est très difficile, au niveau d'un lot comme au niveau d'une série de lots, de détecter dans les conditions pratiques les lots qui sont contaminés. Des mesures complémentaires au contrôle final doivent être mises en œuvre.

C-1. Contrôle de la production finale d'un lot

Dans cette section sont décrites et discutées les différentes composantes de protocoles de contrôle réalisables sur le produit fini. Elles sont présentées de manière paramétrée pour permettre la spécification synthétique de différentes pratiques réelles ou potentielles, et d'en mieux comparer les avantages et les inconvénients.

La base de la réflexion et des hypothèses avancées relatives aux protocoles d'échantillonnage qui sont développées ici provient de l'article de Habraken *et al.* (1986) relatif à *Salmonella* dans ce même type d'aliments. Elle a été complétée par les informations recueillies lors des entretiens ou correspondances avec les industriels consultés.

C-1.1. Modélisations de la fabrication et de la contamination

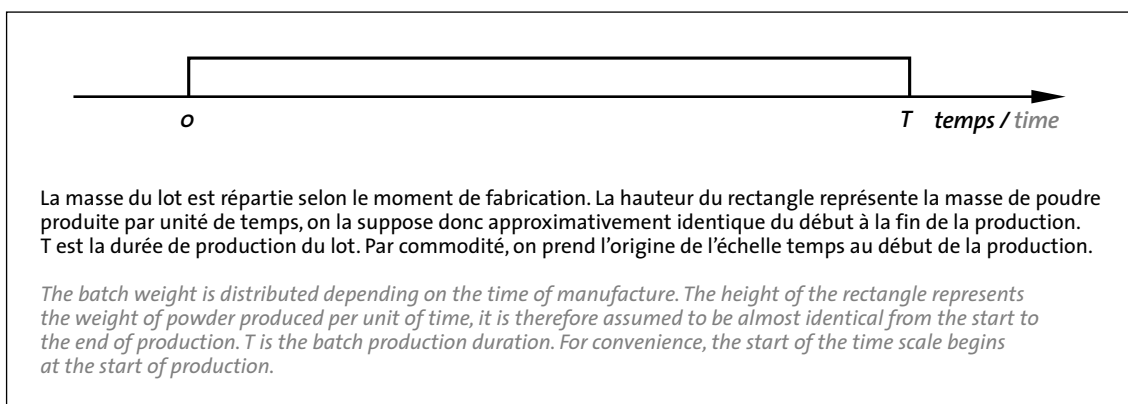
Dans cette partie la manière dont les pathogènes se répartissent dans le lot de poudre est modélisée. Nous nous placerons dans le cadre de la production d'un lot de poudre s'étendant sur une période d'environ 24 h et correspondant à une masse comprise entre 5 et 50 tonnes. Nous noterons M la masse du lot produite exprimée en kilogrammes et nous supposerons qu'elle s'élabore à vitesse constante sur un intervalle de T secondes. Même si elle n'est pas aisée à retrouver, la production d'un lot de poudre se faisant en continu, il existe une correspondance complète entre un très petit volume de poudre et le moment de sa production.

L'aspect temporel de la production étant essentiel⁽²¹⁾ pour la survenue de contaminations, c'est au travers de l'échelle des temps que seront appréhendées des parties du lot. On décrira donc un lot étudié par un segment de durée T sur la droite du temps (Figure 4).

(21) Qu'il s'agisse d'une contamination accidentelle ou d'une contamination par un foyer installé

Figure 4: Représentation de la production d'un lot en fonction du temps

Figure 4: Representation of the production of a batch over time

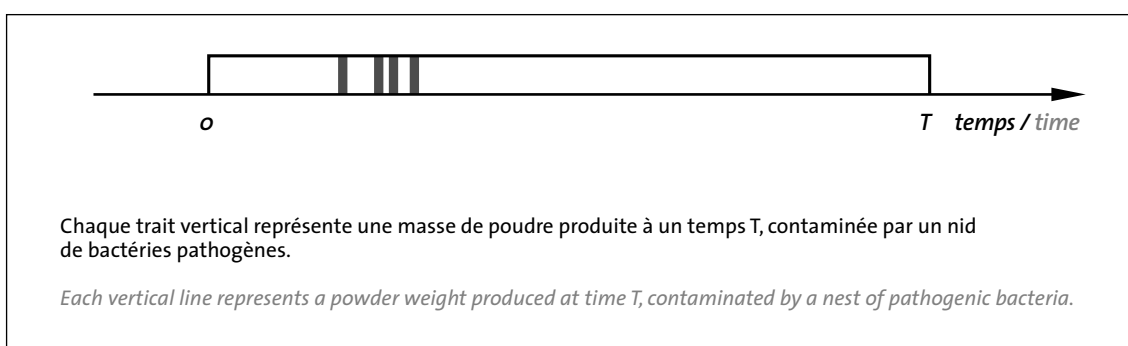


Le volume de poudre comprend un certain nombre de points de contamination que nous dénommerons nids de contamination pour nous rapprocher de l'équivalent anglais⁽²²⁾. Un nid peut comprendre une ou plusieurs bactéries pathogènes, mais comme elles ne peuvent être dissociées que par dilution, c'est bien le niveau de contamination élémentaire qu'il faut considérer au niveau de la poudre.

La contamination du lot est complètement caractérisée par les emplacements dans le volume total de ces nids, dans notre cadre, on peut les assimiler aux moments de production sur la droite du temps (Figure 5).

Figure 5: Représentation des contaminations ponctuelles au cours de la production d'un lot

Figure 5: Representation of occasional contamination while a batch is being produced



Suivant l'idée que les contaminations sont accidentelles donc rares mais de survenues groupées (Habraken *et al.* 1986)⁽²³⁾, on modélisera leur répartition en deux niveaux :

1. La zone contaminée du lot : un intervalle contigu de la représentation temporelle, il est paramétré par sa longueur en proportion du lot [P_c pour proportion contaminée]. Sa localisation est supposée aléatoire sur l'ensemble du lot ;
2. Les nids de contamination sont en nombre défini par un deuxième paramètre dans la zone contaminée. Ils y sont répartis aléatoirement et indépendamment les uns des autres⁽²⁴⁾. Nous avons adopté comme paramètre N_c [pour nombre de nids contaminés], le nombre de nids de contamination par kg sur l'ensemble du lot⁽²⁵⁾.

(22) « nest ».

(23) Des hypothèses expliquant l'agrégativité pourraient être que la contamination provient de l'environnement ou de l'addition d'ingrédients, par exemple d'ingrédients humides.

(24) C'est-à-dire que la position de chaque nid suit une loi uniforme sur le segment contaminé et ces positions sont indépendantes entre elles.

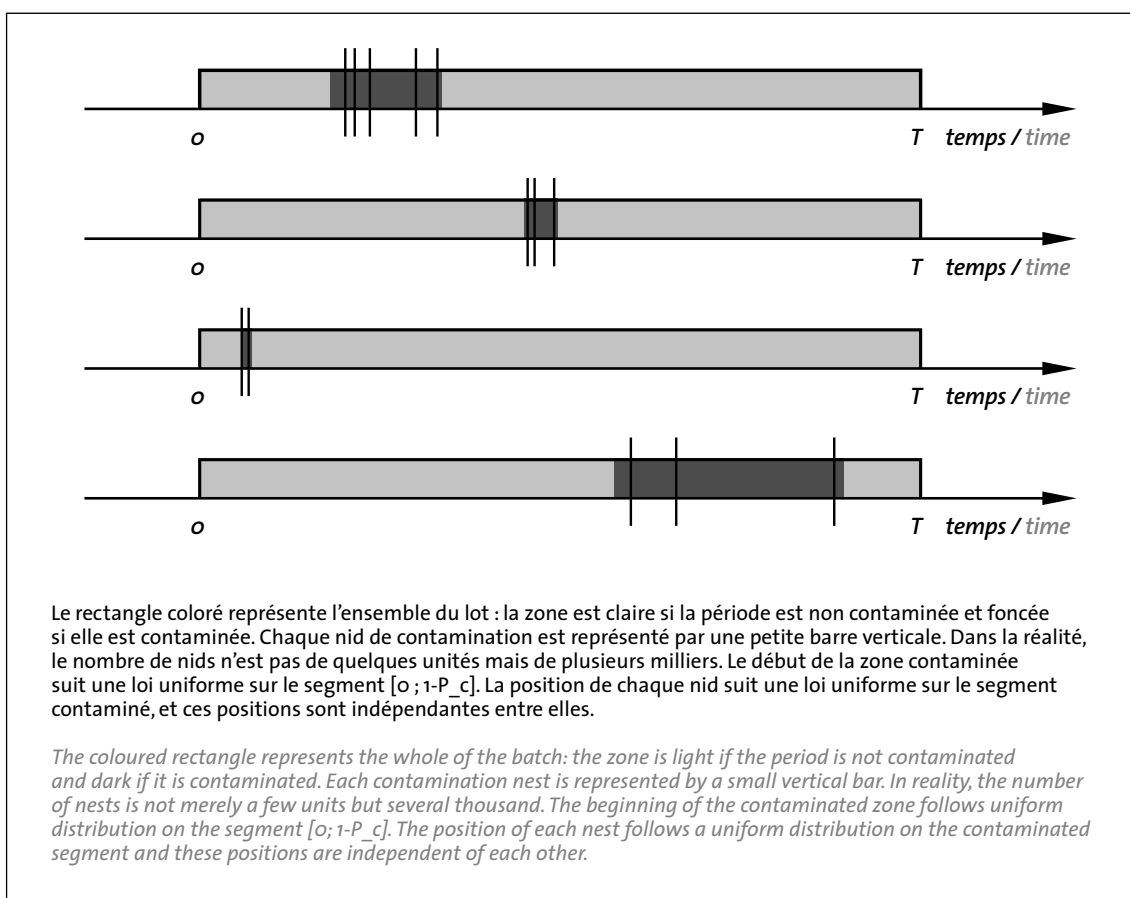
(25) Et non pas par kg sur la seule zone contaminée.

La modélisation de la fabrication et de la contamination est donc basée sur trois paramètres (M_I , P_c et N_c). Le deuxième s'interprète comme un indice de l'agrégativité de la contamination : si P_c tend vers zéro, alors tous les nids sont au même endroit, si $P_c = 1$, on retrouve une répartition poissonnienne conditionnée par le nombre de nids sur l'ensemble du lot. Le troisième paramètre caractérise très directement le niveau de contamination⁽²⁶⁾. La Figure 6 donne quelques exemples de telles contaminations.

On pourrait imaginer des scénarios de contamination différents, comprenant par exemple plusieurs zones contaminées indépendantes. En fait ce cas de figure est intermédiaire entre une seule zone localisée et une seule zone qui couvre l'ensemble du lot ($P_c = 1$). Le choix retenu permet donc d'explorer des situations extrêmes.

Figure 6 : Quelques exemples illustratifs de contamination

Figure 6: Some illustrations of contamination



(26) Attention, il s'agit de la densité sur l'ensemble du lot, pas de celle de la partie contaminée.

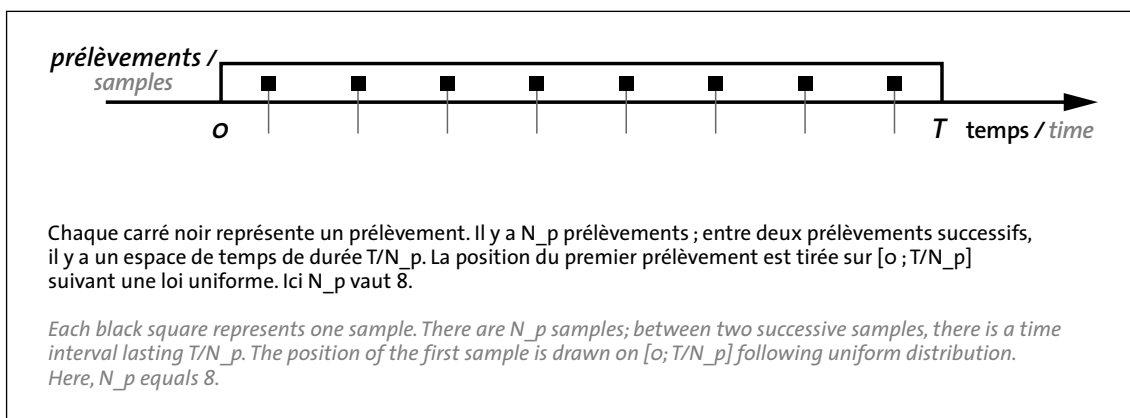
C-1.2. Plan d'échantillonnage

Le but de l'échantillonnage est de permettre de détecter si le lot est contaminé ou pas. Pour cela un certain nombre de petits volumes de poudre sont prélevés. Nous supposons que les prélèvements se font en fin de ligne de production mais avant le stockage. De cette manière, à chaque prélèvement correspond un point sur notre échelle de temps (Figure 7). Un échantillonnage se caractérise donc par : N_p le nombre de prises, mais aussi les moments (sur l'échelle du temps de la production) auxquels ils sont réalisés ainsi que leurs masses respectives. Parce que cela correspond à la très grande majorité des pratiques et que cela est l'approche commune, nous ne considérerons que des échantillons dont les masses des prises sont toutes égales (à M_p) et dont les moments de prise sont répartis à intervalles réguliers (échantillonnage systématique⁽²⁷⁾). Un plan d'échantillonnage sera donc caractérisé par deux paramètres :

- le nombre de prises, paramètre que nous noterons N_p ;
- la masse de chaque prise, paramètre que nous noterons M_p .

Figure 7 : Échantillonnage systématique

Figure 7: Systematic sampling



(27) Seule la position du premier prélèvement est déterminée par tirage au sort, les autres sont ensuite placés systématiquement par rapport à lui. Par rapport à l'échantillonnage aléatoire complet, l'avantage de l'échantillonnage systématique est double : il est plus aisé à mettre en pratique et il est plus puissant en cas d'agrégativité (Habraken et al, 1986). Son inconvénient est de rendre les calculs des probabilités plus difficiles.

C-1.3. Stratégie d'analyse microbiologique

Lorsque les prélèvements de poudre échantillonnés sont définis, différentes stratégies peuvent aussi être appliquées pour la réalisation des analyses microbiologiques⁽²⁸⁾. Citons les principales variantes rencontrées de stratégie d'analyses :

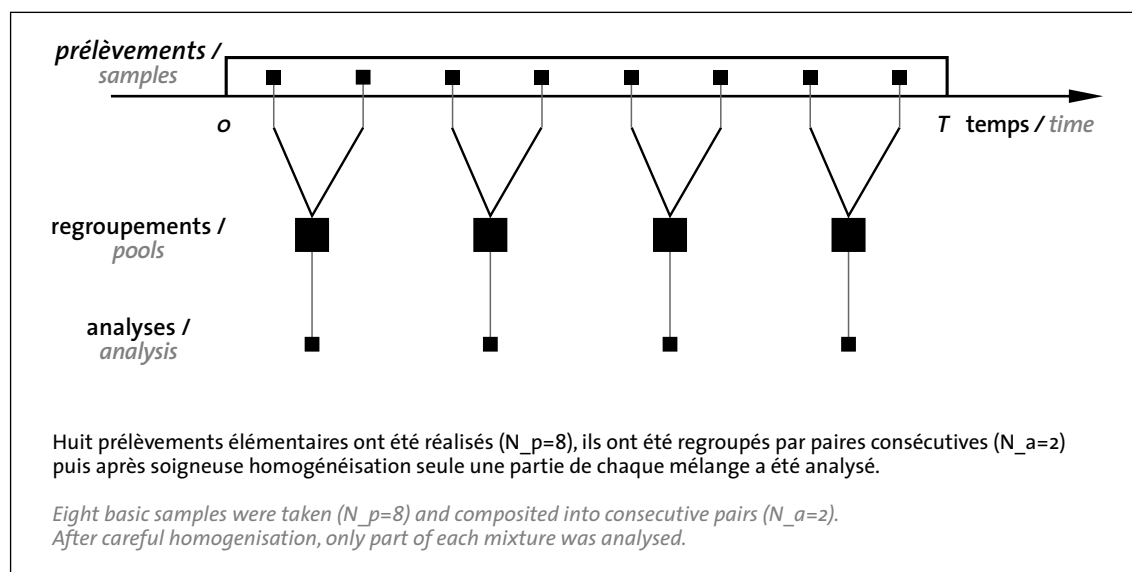
- chaque prélèvement est analysé indépendamment ;
- les prélèvements successifs sont regroupés⁽²⁹⁾ par paquets de prélèvements consécutifs et toute la poudre mélangée est analysée ;
- les prélèvements successifs sont regroupés par paquets de prélèvements consécutifs et après homogénéisation, seulement une fraction de la poudre est analysée ;
- le regroupement en paquets des prélèvements se fait de manière différente au début, au milieu et à la fin de la production⁽³⁰⁾.

Pour essayer de couvrir de manière systématique la majorité de ces possibilités, nous définirons une stratégie d'analyse basée sur N_p prélèvements tels que définis précédemment, complétée par deux paramètres :

- N_a : le nombre de prélèvements successifs qui sont regroupés (avec mélange soigneux) avant l'analyse microbiologique⁽³¹⁾ ($N_a = 2$, dans l'exemple représenté par la Figure 8) ;
- P_a : la proportion de la poudre regroupée qui est analysée microbiologiquement.

Figure 8 : Exemple de protocole

Figure 8: Protocol example



D'autres protocoles peuvent être mis en oeuvre, par exemple un enrichissement sur chaque prélèvement élémentaire avant regroupement. Dans cet exemple, la probabilité de détection serait supérieure à celle de la procédure que nous avons retenue, dans le cas où la sensibilité décroît en fonction de la masse de poudre analysée.

(28) Une analyse microbiologique se traduit par le fait que le pathogène recherché est présent ou pas. Parfois le niveau de contamination du volume prélevé peut aussi être apprécié. Mais dans le cas de pathogènes présents à très faible concentration qui nous occupe, une phase d'enrichissement est nécessaire, l'information quantitative n'est alors plus disponible.

(29) Poolage.

(30) Cette différenciation est en lien avec l'idée que les contaminations sont plus probables en début et en fin de processus, et qu'il faut donc y porter plus d'attention. Nous n'avons pas pris cette possibilité en compte dans nos investigations.

(31) On supposera donc que N_a est un diviseur exact de N_p . Ne pas confondre N_a et le nombre d'analyses réalisées après regroupement (par exemple 4, comme présenté dans la Figure 8).

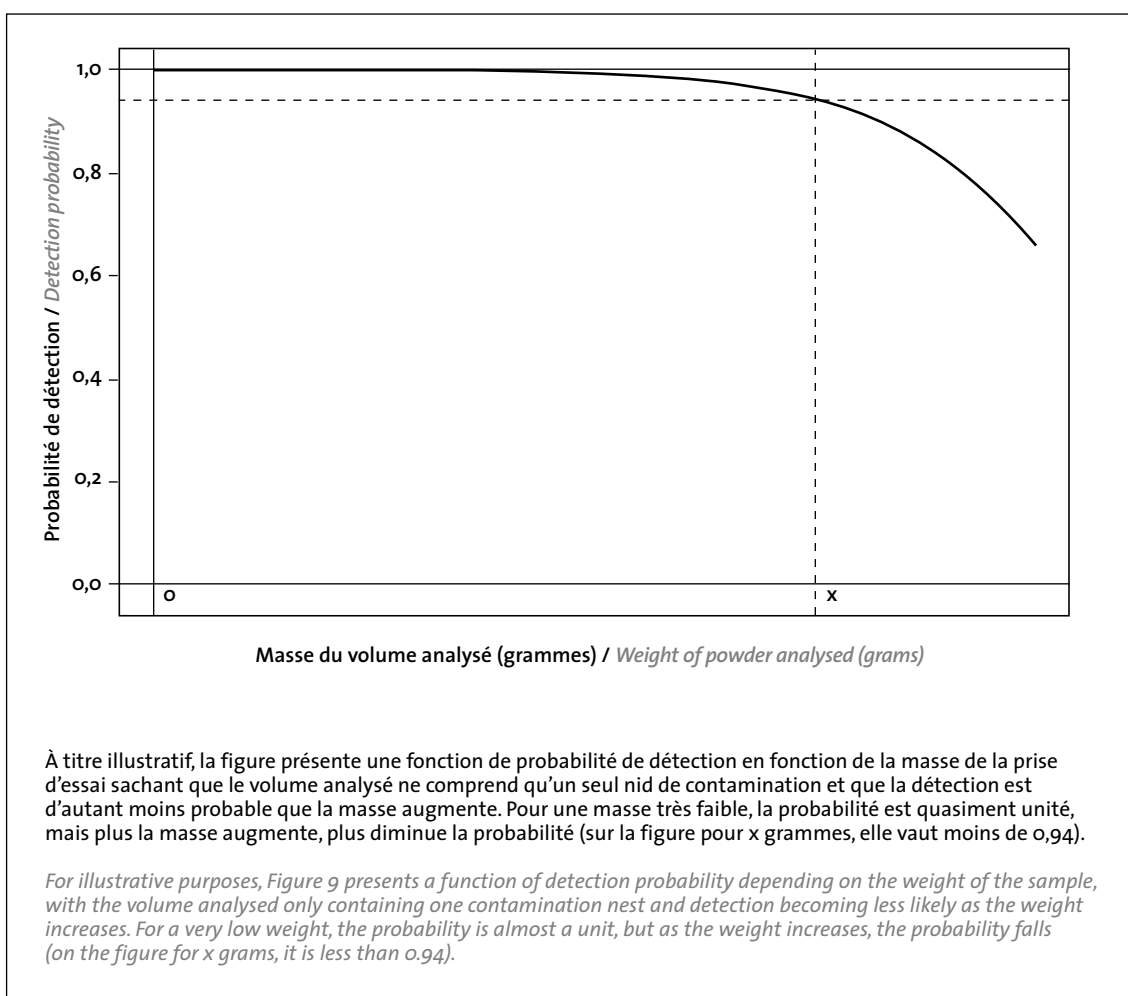
C-1.4. Sensibilité de la détection

Suivant le protocole de détection utilisé, les analyses microbiologiques peuvent être faites sur des volumes de poudre différents. Si on ne s'intéresse qu'à l'occurrence d'au moins une détection et qu'on suppose que la présence d'au moins un nid dans le volume analysé sera toujours détectée, il est clair qu'il faut regrouper l'ensemble des prélèvements élémentaires pour n'effectuer qu'une unique analyse microbiologique. Ceci n'est sans doute raisonnable que sur une plage de volume de la poudre analysée. Pour *Salmonella*, le regroupement est communément pratiqué, et il est même recommandé par certains auteurs (Silliker & Gabis 1973; ICMSF 1974; ADASC 1999). Pour les *Enterobacteriaceae* et *E. sakazakii*, l'influence du regroupement ne semble pas avoir encore fait l'objet de publications.

Dans l'idéal, il faudrait pouvoir disposer de la fonction de sensibilité, c'est-à-dire la probabilité de détecter le seul nid présent en fonction du volume de poudre analysé. La Figure 9 propose une idée sans fondement d'une telle fonction. Malheureusement, il ne semble pas exister de données, ou même d'expertise à ce sujet. Nous avons donc supposé que cette probabilité est constante et vaut 1. Ceci revient à ne pas pouvoir statuer sur le niveau des regroupements à effectuer.

Figure 9 : Probabilité de détection en fonction de la masse analysée

Figure 9: Detection probability depending on the weight analysed



Nous considérons important que des expérimentations soient entreprises à ce sujet pour optimiser en connaissance de cause le protocole de mesure de la contamination.

C-1.5. Résultats du protocole

Tels qu'envisagés dans les sections précédentes, les protocoles se traduisent par un $N_r = N_p/N_a$ résultats d'analyses microbiologiques, chacun étant soit positif, soit négatif. Autrement dit, nous avons affaire à une variable aléatoire qui peut prendre des valeurs entières comprises entre 0 et N_r . Attention, ce n'est pas parce que les probabilités de chaque résultat sont égales qu'il s'agit toujours d'une variable binomiale, en effet les résultats des analyses ne sont indépendants qu'en situation de non agrégativité, c'est-à-dire lorsque $P_c=1$. Quoiqu'il en soit, il ne nous semble pas naturel de distinguer d'autre résultat « **qu'au moins une analyse est positive** » de son complémentaire « **aucune analyse n'est positive** ». C'est un parti pris qui reflète l'importance de la détection. Plus précisément, nous nous intéresserons à P_d , la probabilité de détection, soit la probabilité que le nombre de résultats positifs soit supérieur ou égal à un.

Cette polarisation sur la probabilité de détection laisse de côté l'autre possibilité d'erreur qui est de détecter à tort une contamination. Cependant, ce dernier type d'erreur est bien négligeable si nous admettons implicitement que lorsque le lot de poudre est exempt de nids de contamination la probabilité d'un résultat positif est nulle. En d'autres termes, la spécificité des analyses microbiologiques est supposée parfaite.

Soulignons que de ne s'intéresser qu'à la probabilité de détection correspond à l'objectif d'obtention de lots définis comme étant exempts de toute contamination. S'il s'agissait d'obtenir des lots dont le niveau de contamination était inférieur à un certain seuil⁽³²⁾, alors l'optique devrait être différente car on pourrait très bien accepter, lorsque la puissance de détection est très forte (par exemple N_p et M_p très élevés) une voire deux d'analyses microbiologiques positives.

C-1.6. Considérations générales

Sans aucun calcul, on peut déjà poser quelques éléments d'analyse qualitative et intuitive de la situation.

- Le niveau de contamination (N_c). Plus il est élevé, meilleure sera la probabilité de détection, néanmoins l'influence de ce facteur dépend fortement de l'agrégativité.
- La non-agrégativité (P_c). Moins elle est élevée, c'est-à-dire plus la situation est agrégative, plus la détection est irrégulière dans le sens où pour un même niveau de contamination on trouvera beaucoup ou pas de contamination suivant que les prélèvements tomberont ou pas dans la zone contaminée. Dans la mesure où le niveau de contamination n'est pas mesuré, mais simplement la présence ou l'absence de la bactérie, alors l'agrégativité devrait se traduire aussi par une diminution de la probabilité de détection. Les calculs montreront qu'elle a un autre effet pervers.
- Le nombre de prélèvements (N_p). La probabilité de détection ne peut qu'être une fonction croissante de N_p : ajouter un prélèvement, augmente les chances de trouver des contaminants.
- La masse prélevée à chaque prélèvement (M_p): même affirmation, toutes choses étant égales par ailleurs.
- Le nombre de prélèvements regroupés (N_a) pour effectuer une analyse microbiologique. Si nous admettons que la sensibilité est parfaite (cf. section C - 4), le regroupement n'aura aucun effet sur P_d , bien qu'il en ait certainement sur le nombre d'analyses positives qui ne peut qu'être inférieur ou égal à N_p puisque l'analyse positive d'une prise d'essai peut provenir de plusieurs prélèvements élémentaires contaminés. On aurait donc pu se dispenser de prendre ce facteur en compte, mais il est important de le conserver pour deux raisons: (i) on disposera sans doute un jour d'information sur la fonction de sensibilité, (ii) mais dès à présent, on peut le conjuguer avec la proportion de poudre analysée (P_a), pour faire des comparaisons de différents protocoles présentant, par analyse microbiologique, des masses de poudres égales.
- La proportion de poudre analysée dans un regroupement (P_a). Plus elle est forte et plus élevée doit être la probabilité de détection, toutes choses égales par ailleurs.

Si on peut avoir immédiatement une idée de l'influence de chaque facteur isolément, il est beaucoup plus difficile d'imaginer la manière dont leurs effets se conjuguent, s'annulent ou se multiplient. Pour avoir une idée de ces interactions probables, il faut recourir au calcul. Celui-ci doit être numérique si tous les effets doivent être pris en compte car le calcul analytique ne semble pas possible.

D'un point de vue pratique, la question posée est celle de l'optimisation des moyens disponibles en conjonction avec la prise en compte d'objectifs minimaux à satisfaire. Ce genre de considérations ne peut être abordé que dans le cadre d'applications précises, nous établirons ici quelques résultats généraux qui pourront servir de premiers guides pour des investigations plus poussées.

(32) Et parfois, on peut se demander si ce n'est pas le cas ?

C-1.7. Calculs numériques

Plan des calculs

Des simulations numériques ont été entreprises suivant les différentes situations de contamination et suivant les différents protocoles de contrôle adoptés, dans le but d'apprécier la qualité de l'information obtenue pour décider si un lot est défectueux ou pas. Les calculs obtenus ont été programmés en langage R (Anonyme 2005).

Une simulation élémentaire correspond à un cas de figure précisé par les valeurs des sept paramètres suivants :

- M_l : masse totale en kg du lot de poudre produit ;
- N_c : nombre moyen de nids de contamination sur l'ensemble du lot par kg de poudre ;
- P_c : proportion de la zone, par rapport à l'ensemble du lot, dans laquelle se trouvent les nids ;
- N_p : nombre de prélèvements élémentaires effectués ;
- M_p : masse en kg de chaque prélèvement élémentaire ;
- N_a : nombre de prélèvements élémentaires successifs dans un regroupement (1 signifie qu'il n'y a pas de regroupements) ;
- P_a : proportion de poudre analysée à partir de la poudre obtenue (après un regroupement de prélèvements élémentaires ou non).

Il sera caractérisé par P_d , la probabilité de détection, c'est-à-dire la découverte d'au moins un nid de contamination sur l'ensemble des analyses microbiologiques pratiquées sur un lot. La probabilité d'acceptation à tort d'un lot contaminé (nommée « risque client ») n'est autre que la probabilité complémentaire ($1 - P_d$) et peut donc aisément être déduite des résultats présentés ci-après.

Une première investigation a consisté, en fixant $M_l = 30\,000$ ⁽³³⁾, à explorer l'effet des six derniers paramètres sur P_d , la probabilité qu'au moins une analyse soit positive, associée à la décision systématique la plus stricte que l'on puisse prendre pour refuser le lot. Pour ce faire les 18.225 combinaisons des valeurs des paramètres suivantes ont été réalisées :

- N_c : cinq valeurs (0,001 / 0,01 / 0,1 / 1 / 10),
- P_c : neuf valeurs : (0,001 / 0,01 / 0,02 / 0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,5 / 0,8 / 1),
- N_p : cinq valeurs (10 / 30 / 60 / 120 / 180),
- M_p : neuf valeurs (kg) (0,005 / 0,010 / 0,025 / 0,035 / 0,050 / 0,070 / 0,100 / 0,135 / 0,300),
- N_a : trois valeurs (1 / 2/5),
- P_a : trois valeurs (0,1 / 0,5 / 1).

C-1.8. Questions particulières

Par souci de pragmatisme, la situation a été encore simplifiée pour donner des réponses simples à un certain nombre de questions clefs. A partir de maintenant, seuls deux types d'agrégativité seront considérés ($P_c = 0,02$ et 1) ; Les prélèvements élémentaires seront toujours regroupés par deux ($N_a = 2$) ; et toute la poudre du regroupement sera analysée ($P_a = 1$).

Q1: Quel nombre de prélèvements élémentaires de 50 g faut-il pratiquer pour détecter dans 95 % des cas que le niveau de contamination dépasse 0,01, 0,1, 1 nid par kg ?

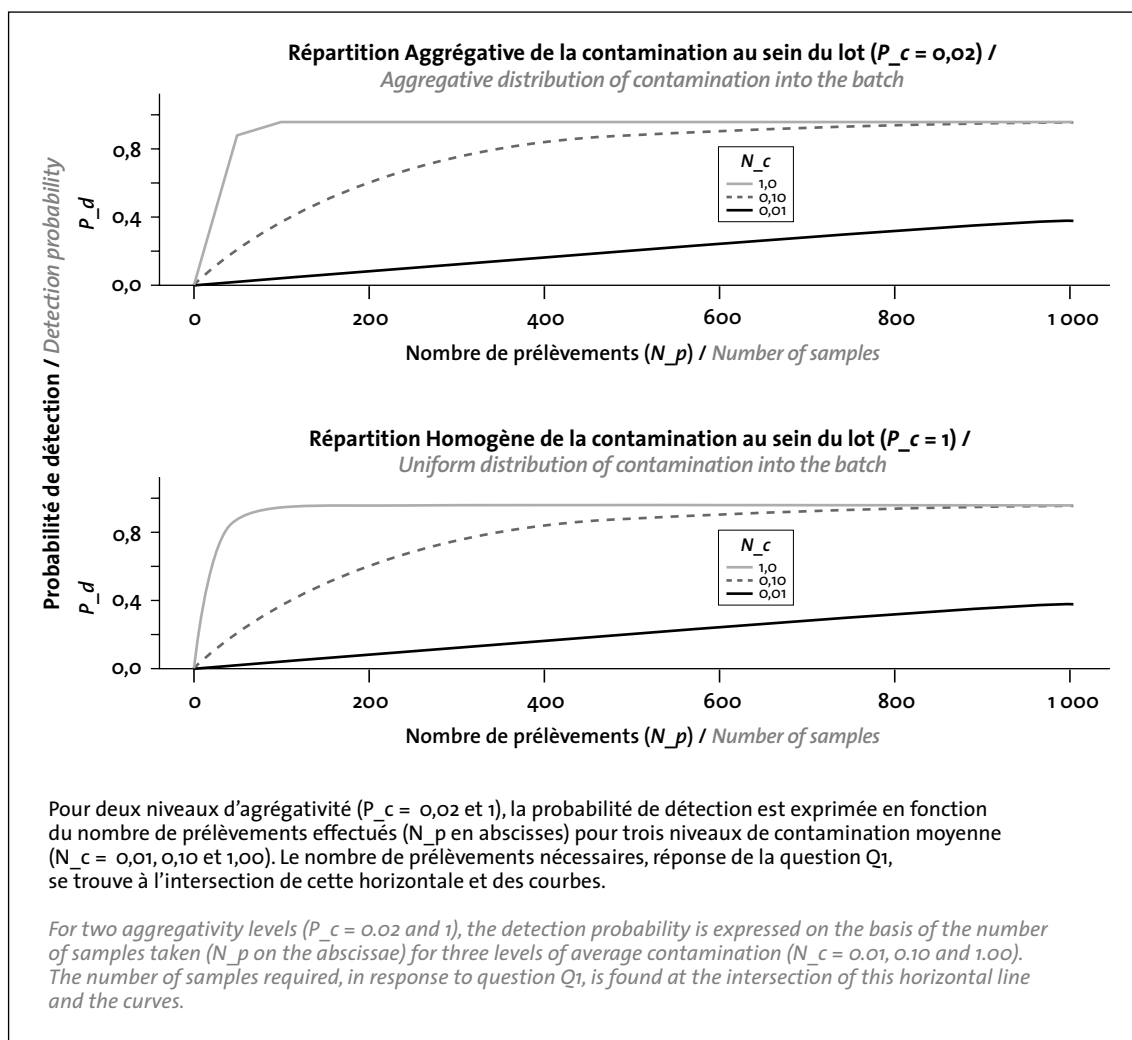
Q1: How many 50g basic samples are needed to detect a contamination level exceeding 0.01, 0.1, 1 nest per kg in 95% of cases?

Étant donné que la probabilité de détection est une fonction croissante du niveau de contamination, le nombre de prélèvements nécessaire est obtenu pour les niveaux minimaux. Autrement dit la question est transformée en « Si le niveau de contamination est 0,01 (ou 0,1, ou encore 1) nid par kg, quel nombre de prélèvements élémentaires faut-il pour que la probabilité de détection soit 0,95 ? » La Figure 10, qui représente la probabilité de détection en fonction du nombre de prélèvements, permet de trouver les réponses à ces questions, réponses qui sont reportées dans le Tableau 9.

(33) Faire varier M_l n'a pas d'effet car ce qui compte, c'est la proportion de poudre contaminée, reflétée par les autres paramètres.

Figure 10 : Réponse à la question Q1

Figure 10: Response to question Q1



On peut y constater que le caractère agrégatif ou pas de la contamination n'a pas une incidence notable sur la courbe de probabilité de détection. En revanche si le niveau de contamination est faible, il faut augmenter de manière catastrophique le nombre de prélèvements nécessaires pour obtenir la probabilité de détection désirée. Lorsque $N_c = 0,01$, alors 1000 prélèvements sont même tout à fait insuffisants !

Tableau 9 : Réponse à la question Q1

Table 9: Response to question Q1

	$N_c = 0,010$	$N_c = 0,100$	$N_c = 1,000$
$P_c = 0,02$	>> 1000	600	70
$P_c = 1,00$	>> 1000	600	60

Nombres de prélèvements nécessaires pour obtenir une probabilité de détection de 0,95, dans le cadre de la question Q1, obtenus en lisant la Figure 10.

Number of samples required to obtain a detection probability of 0.95, in the framework of question Q1, obtained by reading Figure 10.

Q2 : Quel est le niveau de contamination des lots acceptés à tort dans 5 % des cas, lorsqu'on effectue 30 prélèvements élémentaires, en faisant varier la masse prélevée ?

Q2: What is the contamination level of batches accepted wrongly in 5% of cases, when 30 unit samples are taken, by varying the weight sampled?

Cette question est très intéressante car elle nous révèle une difficulté essentielle du contrôle de qualité en cas d'agrégativité. Le Tableau 10 donne les résultats du calcul.

Tableau 10 : Réponse à la question Q2

Table 10: Response to question Q2

	$M_p = 0,010$	$M_p = 0,025$	$M_p = 0,050$
$P_c = 0,02$	(pas possible) <i>(not possible)</i>	(pas possible) <i>(not possible)</i>	(pas possible) <i>(not possible)</i>
$P_c = 1,00$	10	4	2

Niveau de contamination minimal (N_c , nombre de nids par kg) pour qu'avec 30 prélèvements d'une certaine masse (M_p), on n'accepte à tort le lot que dans 5 % des cas, c'est-à-dire que la probabilité de détection soit égale à 0,95 (question Q2).

Minimum contamination level (N_c number of nests per kg) so that, with 30 samples of a certain weight (M_p), the batch is only accepted wrongly in 5% of cases, i.e. that the detection probability is 0.95 (question Q2).

Contrairement à l'intuition immédiate, il indique qu'il n'y a pas de réponse dans le cas d'agrégativité ! En fait, le « pas possible » de certains cas de figure peut se comprendre assez facilement. Si la contamination reste cantonnée à une petite proportion du lot (dans notre exemple 2 %), alors comme le nombre de prélèvements est ici fixé à 30, ce n'est pas, pour les masses prélevées considérées, parce que le niveau de contamination augmente que la probabilité de détection change. En effet, pour qu'il y ait détection, il faut la conjonction de deux faits : (i) qu'un prélèvement soit dans la zone contaminée, (ii) qu'un prélèvement dans la zone contaminée comprenne un nid de contamination. Si la contamination augmente, alors l'événement (ii) finira par se produire mais l'événement (i) conserve la même probabilité. Il est impossible avec 30 prélèvements et une agrégativité de la contamination (ici $P_c = 0,02$) que la probabilité de détection de la contamination du lot dépasse 0,60. Cette observation conduit donc à formuler une question corollaire.

Q2b : Quelle est la probabilité de détection maximale en fonction de l'agrégativité et du nombre de prélèvements ?

Q2b: What is the maximum detection probability depending on aggregativity and number of samples?

En fait des éléments de la réponse à cette question sont contenus dans l'exploration générale (cf. § C-3), le Tableau 11 donne la réponse particulière dans le contexte réduit de nos questions en admettant un niveau de contamination catastrophique⁽³⁴⁾ de $N_c = 1,00$.

La réponse à la question Q2b peut se résumer, de façon pratique, par un conseil de multiplication des prélèvements. Les techniques d'échantillonnage automatique qui prélèvent quasiment en continu une proportion de la production sont donc tout à fait recommandées.

Tableau 11: Réponse à la question Q2b

Table 11: Response to question Q2b

$\frac{P_c}{N_p}$	0,001	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	0,8	1
10	0,01	0,09	0,20	0,50	1	1	1	1	1
30	0,03	0,30	0,60	1	1	1	1	1	1
60	0,06	0,60	1	1	1	1	1	1	1
120	0,12	1	1	1	1	1	1	1	1
180	0,18	1	1	1	1	1	1	1	1

Probabilité de détection (P_d) calculée pour un très fort niveau de contamination ($N_c = 1,00$) en fonction du nombre de prélèvements élémentaires réalisés (N_p , en ligne) et du niveau d'agrégativité de la contamination (P_c , en colonne) [question Q2b]. On constate bien que même si le nombre de prélèvements est élevé, il n'est pas possible d'arriver à un bon résultat lorsque la contamination est très localisée (agrégativité extrême lorsque P_c est très faible).

Detection probability (P_d) calculated for a very high contamination level ($N_c = 1.00$) depending on the number of basic samples taken (N_p , in the line) and the aggregativity level of contamination (P_c , in the column) [question Q2b]. We are well aware that even if the number of samples is high, it is only possible to obtain a good result if contamination is very localised (extreme aggregativity when P_c is very low).

C-2. Interprétation d'une série de contrôles de lots

Jusqu'ici, nous nous sommes limités au contrôle d'un seul lot. Dans le contexte d'une production industrielle, ces contrôles sont répétés régulièrement (toutes les semaines, tous les jours). Il est aussi intéressant d'interpréter les résultats d'une série de contrôles. En effet la perte de qualité d'une production peut résulter d'un dérèglement, brutal ou graduel, du système de production engendrant une proportion supérieure à la normale de lots défectueux. Il faut pouvoir détecter de tels événements pour déclencher des alarmes le plus tôt possible. C'est l'objet des trois questions pragmatiques de cette sous-section.

Pour aborder cette problématique, il faut statuer sur la manière dont les productions successives sont liées. Le plus logique (et simple) est de supposer que les lots sont indépendants, c'est-à-dire que la connaissance du résultat d'un lot ne modifie pas notre modélisation sur les autres lots mais qu'il peut y avoir un changement brutal ou continu des caractéristiques de la contamination au cours du temps.

Une référence utile pour la description statistique de ce type de problème et le renvoi à d'autres références bibliographiques est l'article de Chaouche et Parent (1998).

(34) Catastrophique car $N_c = 1,00$ avec $P_c = 0,02$, cela implique une concentration de 50 nids de contamination par kg dans la zone contaminée!

Q3 : Selon qu'un contrôle est pratiqué chaque semaine ou chaque jour (50 ou 330 contrôles), quels est le nombre de lots détectés par an, pour 30 prélèvements hebdomadaires ou journaliers réalisés, en fonction de la masse prélevée, du niveau de contamination et selon que la contamination est agrégative ou pas ?

Q3: Depending on whether checks are carried out weekly or daily (50 or 330 checks), how many batches are detected annually for 30 weekly or daily samples taken, depending on the weight sampled, contamination level and whether the contamination is aggregative or not?

La question ne le précise pas, mais nous supposons que le processus est stationnaire, la contamination est de même nature⁽³⁵⁾ d'un lot à l'autre. Dans ces conditions, la réponse s'obtient en établissant ce qui se passe pour un lot (cas des questions précédentes) et en appliquant un schéma binomial pour obtenir le résultat sur l'ensemble des lots de l'année. De manière plus précise, il nous faut (i) calculer la probabilité de détection pour un lot en faisant varier les 3 paramètres M_p , N_c et P_c , (ii) nous en servir pour une binomiale de taille 50 ou 330. Les résultats obtenus sont proposés dans le Tableau 12.

Si la contamination est forte et si un effort de détection important est mis en œuvre, la majorité des lots sont détectés. A titre illustratif, si l'ensemble ($P_c=1$) d'un lot était contaminé à raison d'un nid de contamination par kg ($N_c=1$) alors la probabilité de détection d'un lot contaminé serait égale à 0,983. En conséquence, si on pratiquait 30 prélèvements de produit, de 135g chacun, par semaine, on trouverait entre 47 et 50 lots positifs, et 49 en valeur centrale.

Tableau 12 : Réponse à la question Q3

Table 12: Response to question Q3

P_c	N_c	M_p	P_d	N_détectés_50 <i>Number of weekly checked batches detected as positive</i>		N_détectés_330 <i>Number of daily checked batches detected as positive</i>	
				médiane / median	[IC95 %]	médiane / median	[IC95 %]
0,02	0,01	0,010	0,003	0	[0;1]	1	[0;3]
		0,050	0,016	1	[0;3]	5	[1;10]
		0,135	0,040	3	[0;5]	13	[7;21]
	0,10	0,010	0,030	1	[0;4]	10	[4;16]
		0,050	0,134	7	[2;12]	44	[32;57]
		0,135	0,296	15	[9;21]	98	[82;114]
	1,00	0,010	0,238	12	[6;18]	78	[64;94]
		0,050	0,552	28	[21;34]	182	[164;200]
		0,135	0,599	30	[23;37]	198	[180;215]
1,00	0,01	0,010	0,003	0	[0;1]	1	[0;3]
		0,050	0,015	1	[0;3]	5	[1;10]
		0,135	0,039	2	[0;5]	13	[7;20]
	0,10	0,010	0,029	1	[0;4]	10	[4;16]
		0,050	0,140	7	[3;12]	46	[34;59]
		0,135	0,332	17	[10;23]	109	[93;126]
	1,00	0,010	0,260	13	[7;19]	86	[70;102]
		0,050	0,777	39	[33;44]	256	[241;271]
		0,135	0,983	49	[47;50]	324	[319;328]

Pour les 18 combinaisons possibles de $P_c = \{0,02, 1\}$, $N_c = \{0,01, 0,1, 1\}$ et $M_p = \{0,010, 0,050, 0,135\}$, la probabilité de détection (P_d) de la contamination d'un lot est fournie, avec les conséquences sur 50 (et 330) lots en terme de nombre de lots détectés sur l'année (respectivement, $N_{détectés_50}$ et $N_{détectés_330}$): médiane et bornes de l'intervalle de confiance à 95 % (IC95 %).

For the 18 possible combinations of $P_c = \{0,02, 1\}$, $N_c = \{0,01, 0,1, 1\}$ and $M_p = \{0,010, 0,050, 0,135\}$, the probability (P_d) of the contamination of a batch being detected is provided, with consequences on 50 (and 330) batches in terms of number of batches detected over the year ($N_{detected_50}$ and $N_{detected_330}$ respectively): median and confidence interval bounds at 95% (CI95%).

(35) On ne dit pas identique, car la caractérisation que nous avons prise pour la contamination fait intervenir des aléas, par exemple d'une réalisation à l'autre les emplacements des nids ne sont pas identiques.

Tableau 13 : Réponse à la question Q4

Table 13: Response to question Q4

P_c	M_p	N_défectés_50 <i>Number of weekly checked batches detected as positive</i>		N_défectés_330 <i>Number of daily checked batches detected as positive</i>	
		médiane /median	[IC95 %]	médiane /median	[IC95 %]
0,02	0,01	1	[0 ;10]	10	[0;60]
0,02	0,05	7	[0;26]	44	[6;164]
0,02	0,135	15	[2;32]	97	[17;199]
1	0,01	1	[0;10]	10	[0;64]
1	0,05	7	[0;33]	46	[6;215]
1	0,135	17	[2;47]	110	[18;312]

Pour les 6 combinaisons possibles de $P_c = \{0,02; 1\}$ et $M_p = \{0,010; 0,050; 0,135\}$, le nombre de lots détectés (respectivement sur 50 semaines ou sur 330 jours) est fourni: médiane et bornes de l'intervalle de confiance à 95 % (IC95 %) donnés par les résultats d'une simulation.

For the 6 possible combinations of $P_c = \{0.02; 1\}$ and $M_p = \{0.010; 0.050; 0.135\}$, the number of batches detected (over 50 weeks or 330 days respectively) is provided: median and confidence interval bounds at 95% (CI95%) provided by the results of a simulation.

Q4: Même question qu'en Q3, mais le niveau de contamination est considéré comme une variable aléatoire dont le logarithme décimal est normal d'espérance -1 et d'écart-type 0,5, restreinte à l'intervalle [-2, 0]?

Q4: Same question as Q3, but with the contamination level considered as a random variable whose decimal logarithm is normal with expected mean value -1 and standard deviation 0.5, restricted to the interval [-2, 0]?

Si le calcul est légèrement plus compliqué par le tirage aléatoire du paramètre N_c , la réponse est plus simple à fournir puisque les différentes valeurs de ce paramètre n'ont plus à apparaître. Le Tableau 13 propose les résultats. On remarquera que l'espérance et les valeurs extrêmes de $\log_{10}(N_c)$ sont exactement les trois valeurs examinées dans la question Q3.

L'effet de la masse prélevée (M_p) est prononcé, celui de l'agrégativité est surtout perceptible dans le cas d'un contrôle quotidien.

Q5 : Même question qu'en Q3, mais on suppose que le niveau de contamination augmente régulièrement de 10 % chaque semaine ?

Q5: Same question as Q3, but assuming that the contamination level regularly increases by 10% each week?

Il faut bien mesurer que nous décrivons ici une situation explosive puisqu'en partant des trois niveaux de contamination utilisés en Q3 (respectivement 0,01, 0,1 et 1 nids par kg), on arrive respectivement à la fin de l'année (après 50 semaines) à des contaminations de 1,29, 12,9 et 129 nids par kg (cf. Figure 11). La vraie question n'est donc pas de savoir combien de lots sont détectés mais plutôt, à partir de quel moment l'industriel se rend compte de la dérive catastrophique que suit sa production ? Le critère imaginé pour déclencher l'alarme est un nombre trop grand de lots détectés positifs **consécutivement** sur les derniers contrôles. Le Tableau 14 fournit les résultats pour des séquences de tailles 1 à 10.

Figure 11: Dérives considérées en question Q5

Figure 11: Deviations considered in question Q5

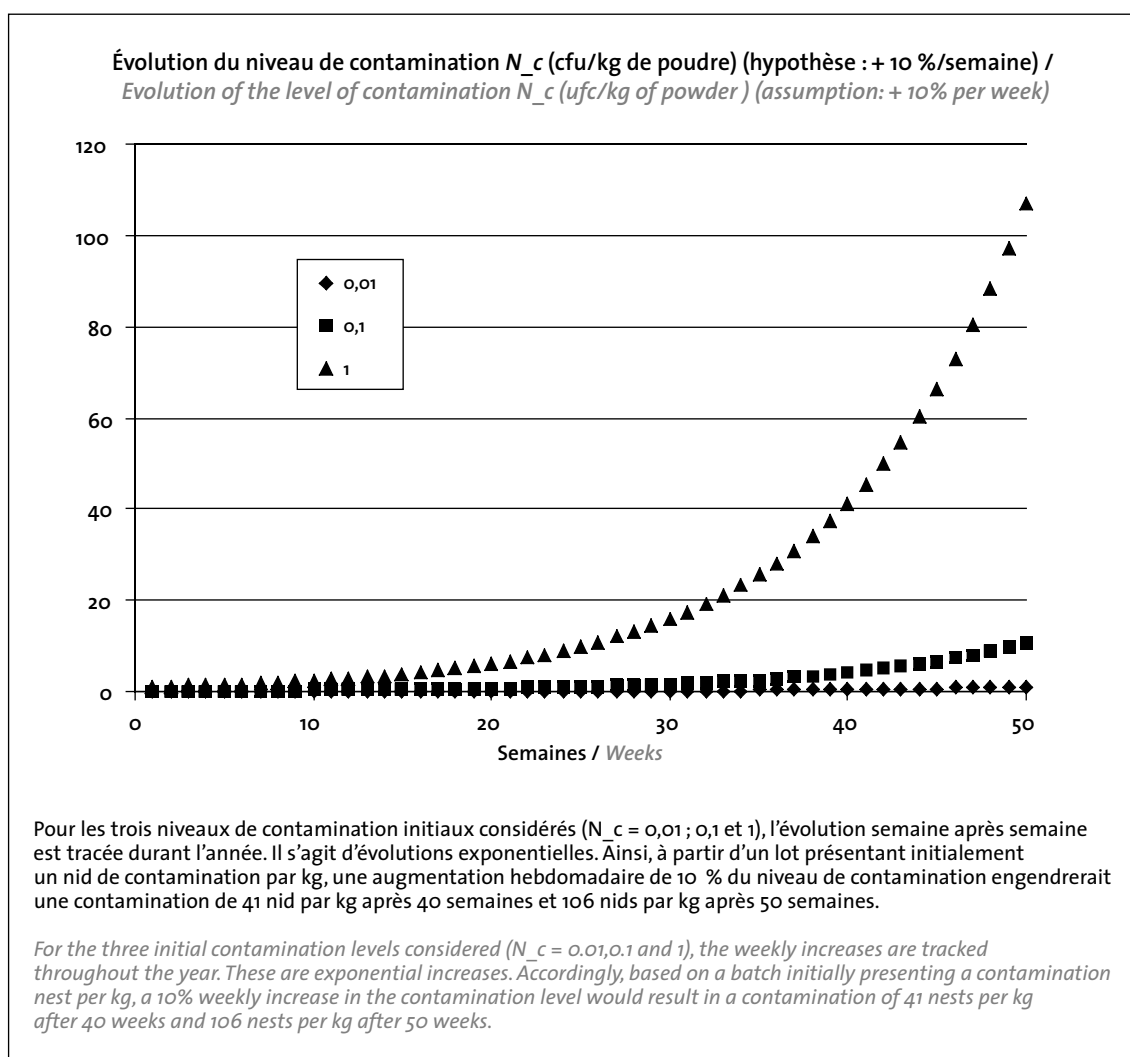


Tableau 14 : Réponse à la question Q5

Table 14: Response to question Q5

sur 50 semaines / among 50 weeks				nombre de lots positifs successifs / number of successive positive batches										
M_p	P_c	N_c_ini		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0.010	0.02	0.01	38	[15;-]	-	[44;-]	-	[-;-]	-	[-;-]	-	[-;-]	-	[-;-]
0.010	0.02	0.10	5	[1;20]	20	[7;-]	42	[11;-]	-	[18;-]	-	[45;-]	-	[48;-]
0.010	0.02	1.00	2	[1;5]	4	[2;10]	8	[3;27]	14	[4;-]	26	[5;-]	31	[7;-]
0.050	0.02	0.01	16	[1;37]	44	[14;-]	-	[32;-]	-	[44;-]	-	[-;-]	-	[-;-]
0.050	0.02	0.10	2	[1;6]	6	[2;17]	12	[3;41]	22	[4;-]	41	[7;-]	-	[18;-]
0.050	0.02	1.00	1	[1;5]	4	[2;11]	7	[3;27]	11	[4;-]	24	[5;-]	40	[6;-]
0.135	0.02	0.01	10	[1;20]	26	[11;43]	38	[16;-]	-	[26;-]	-	[29;-]	-	[35;-]
0.135	0.02	0.10	1	[1;6]	4	[2;11]	8	[3;17]	12	[4;-]	18	[5;-]	34	[6;-]
0.135	0.02	1.00	1	[1;5]	4	[2;12]	7	[3;19]	14	[4;-]	28	[5;-]	42	[6;-]
0.010	1.00	0.01	36	[11;-]	-	[34;-]	-	[-;-]	-	[-;-]	-	[-;-]	-	[-;-]
0.010	1.00	0.10	4	[1;14]	20	[2;37]	32	[5;-]	48	[25;-]	-	[35;-]	-	[37;-]
0.010	1.00	1.00	1	[1;2]	2	[2;7]	4	[3;12]	5	[4;15]	8	[5;16]	10	[6;21]
0.050	1.00	0.01	18	[2;32]	41	[16;-]	-	[26;-]	-	[47;-]	-	[48;-]	-	[-;-]
0.050	1.00	0.10	2	[1;4]	4	[2;11]	6	[3;18]	13	[4;27]	15	[5;32]	19	[7;33]
0.050	1.00	1.00	1	[1;1]	2	[2;2]	3	[3;3]	4	[4;4]	5	[5;5]	6	[6;6]
0.135	1.00	0.01	12	[3;24]	24	[8;38]	32	[20;-]	42	[23;-]	50	[30;-]	-	[37;-]
0.135	1.00	0.10	1	[1;2]	2	[2;5]	3	[3;6]	4	[4;8]	6	[5;12]	7	[6;13]
0.135	1.00	1.00	1	[1;1]	2	[2;2]	3	[3;3]	4	[4;4]	5	[5;5]	6	[6;6]

sur 330 jours / among 330 days				nombre de lots positifs successifs / number of successive positive batches										
M_p	P_c	N_c_ini		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0.010	0.02	0.01	90	[23;202]	316	[178;-]	-	[265;-]	-	[-;-]	-	[-;-]	-	[-;-]
0.010	0.02	0.10	6	[1;19]	45	[4;114]	136	[23;231]	192	[43;-]	279	[86;-]	-	[187;-]
0.010	0.02	1.00	2	[1;7]	4	[2;11]	6	[3;28]	12	[4;63]	30	[5;126]	51	[7;212]
0.050	0.02	0.01	34	[2;101]	145	[38;214]	246	[138;-]	322	[184;-]	-	[230;-]	-	[321;-]
0.050	0.02	0.10	2	[1;7]	7	[2;18]	12	[4;51]	36	[6;98]	74	[10;133]	92	[18;285]
0.050	0.02	1.00	1	[1;4]	4	[2;14]	7	[3;24]	13	[4;45]	22	[5;109]	42	[8;149]
0.135	0.02	0.01	16	[1;56]	104	[13;160]	146	[78;222]	190	[108;288]	224	[150;-]	296	[193;-]
0.135	0.02	0.10	1	[1;5]	4	[2;15]	7	[3;30]	18	[4;57]	32	[5;81]	47	[6;225]
0.135	0.02	1.00	1	[1;4]	3	[2;12]	6	[3;20]	13	[4;42]	21	[5;72]	33	[7;144]
0.010	1.00	0.01	96	[4;199]	320	[158;-]	-	[308;-]	-	[309;-]	-	[-;-]	-	[-;-]
0.010	1.00	0.10	4	[1;21]	46	[7;100]	114	[36;193]	179	[94;274]	228	[117;302]	270	[184;315]
0.010	1.00	1.00	1	[1;3]	2	[2;7]	5	[3;12]	7	[4;21]	10	[5;27]	14	[6;32]
0.050	1.00	0.01	36	[8;89]	137	[88;195]	216	[100;302]	296	[155;-]	-	[238;-]	-	[292;-]
0.050	1.00	0.10	1	[1;4]	4	[2;12]	10	[3;37]	20	[4;61]	32	[6;79]	50	[10;89]
0.050	1.00	1.00	1	[1;1]	2	[2;2]	3	[3;3]	4	[4;4]	5	[5;5]	6	[6;6]
0.135	1.00	0.01	14	[1;50]	84	[25;140]	146	[53;206]	178	[129;236]	205	[130;266]	239	[146;306]
0.135	1.00	0.10	1	[1;2]	2	[2;6]	3	[3;9]	4	[4;14]	6	[5;19]	8	[6;31]
0.135	1.00	1.00	1	[1;1]	2	[2;2]	3	[3;3]	4	[4;4]	5	[5;5]	6	[6;6]

Pour les 18 combinaisons de $P_c = \{0,02;1\}$, N_c au début de la production valant $\{0,01;0,1;1\}$ et $M_p = \{0,010;0,050;0,135\}$, le jour de l'alarme est calculé pour 50 contrôles hebdomadaires (et 330 contrôles journaliers). Chaque calcul se base sur 50 000 simulations numériques. Pour simuler une situation de dérive, le niveau de contamination augmente régulièrement de 10 % par semaine. Pour chaque combinaison, on s'intéresse au numéro de contrôle à partir duquel on a observé un contrôle positif ou 2,3,4,5,6,7,8,9 ou 10 contrôles positifs successifs pour la première fois sur la séquence (50 semaines ou 330 jours). Les résultats comportent la médiane (considérée comme l'estimation) et les quantiles 0,025 et 0,975 (considérés comme bornes de l'intervalle de confiance) du numéro du jour qui est une variable aléatoire. Les valeurs non portées (-) correspondent au fait que la série n'est pas assez longue pour connaître le percentile en question. Par exemple, sur 50 semaines et pour $M_p = 0,01$, $P_c = 0,02$ et $N_c_{ini} = 0,01$, le nombre de fois où on se trouve en présence de deux détections successives n'atteint pas la moitié des 50 000 simulations, la médiane n'a donc pas pu être chiffrée, d'un point de vue pratique, cela signifie que cela arrive rarement; bien entendu le quantile 0,975 n'a pas pu être déterminé. Par contre dans 2,5 % des cas, la détection se fait avant la 44^e semaine.

For the 18 combinations of $P_c = \{0.02;1\}$, N_c at the start of production worth $\{0.01; 0.1;1\}$ and $M_p = \{0.010; 0.050; 0.135\}$, the alert day is calculated for 50 weekly checks (and 330 daily checks). Each calculation is based on 50,000 numerical simulations. To simulate a deviation situation, the contamination level increases regularly by 10% each week. For each combination, we are interested in the number of checks from which a positive control is observed, or 2,3,4,5,6,7,8,9 or 10 successive positive checks for the first time in the sequence (50 weeks or 330 days). The results contain the median (considered to be the estimation) and the quantiles 0.025 and 0.975 (considered to be confidence interval bounds) of the day number which is a random variable. For the values that are not taken into account (-), the series is not long enough to know the percentile in question. For example, over 50 weeks and for $M_p = 0.01$, $P_c = 0.02$ and $N_c_{ini} = 0.01$, the number of times that two successive detections take place does not reach half of the 50,000 simulations. The median could not be found as a result and from a practical viewpoint, this means that this occurs only rarely. Naturally, the quantile 0.975 could not be determined either. However, in 2.5% of cases, detection is made before the 44th week.

Les chiffres parlent d'eux-mêmes : si la contamination de départ est faible, il faudrait se poser la question dès la première occurrence d'une analyse positive.

Pour poursuivre la réflexion, la distribution du nombre de contrôles positifs consécutifs a été calculée en fonction de la probabilité de détection (P_d) sur un lot (Tableau 15). Cette dernière peut être reprise du Tableau 16.

Tableau 15 : Distribution des longueurs de séquences de détections simultanées

Table 15: Distribution of simultaneous detection sequence lengths

<i>P_d</i>	Médiane / Median	Quantile 0,025	Quantile 0,975
0,01	1	1	1
0,05	1	1	2
0,10	1	1	2
0,15	1	1	2
0,20	1	1	3
0,25	1	1	3
0,30	1	1	4
0,35	1	1	4
0,40	1	1	5
0,45	1	1	5
0,50	1	1	6
0,55	2	1	7
0,63	2	1	8
0,60	2	1	8
0,65	2	1	9
0,70	2	1	11
0,75	3	1	13
0,80	4	1	17
0,85	5	1	23
0,90	7	1	36
0,95	14	1	72
0,96	17	1	91
0,97	23	1	122
0,98	35	2	183
0,99	69	3	368

Pour une probabilité de détection donnée (*P_d*), le nombre de lots détectés positifs successivement, à partir du moment où un premier lot est positif, est caractérisé par sa médiane et les bornes de son intervalle de confiance à 95 %. Par exemple, si *P_d* = 0,63, on aura un nombre de lots positifs successifs le plus souvent autour de 2 et variant entre 1 et 8.

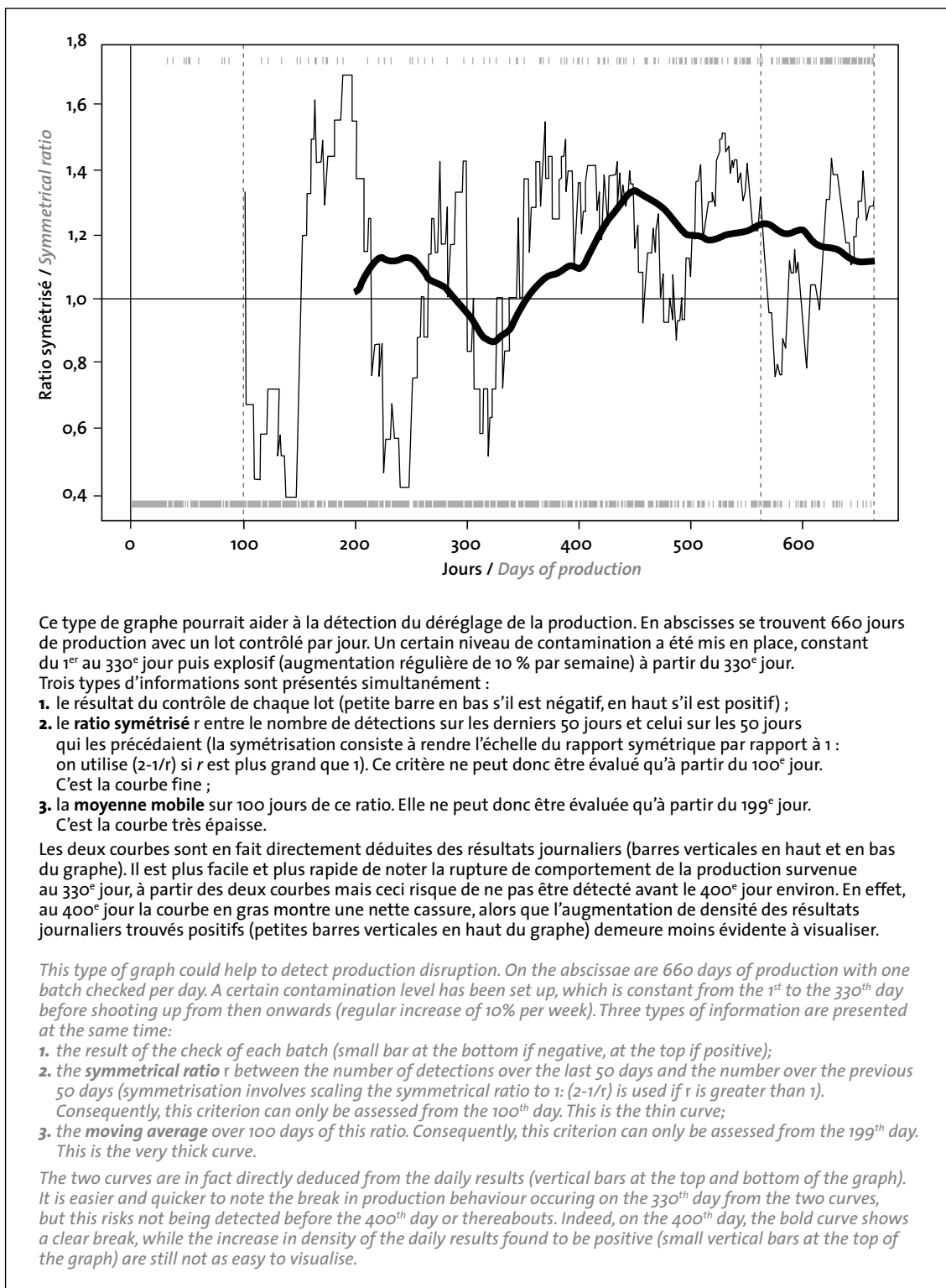
*For a given detection probability (*P_d*), the number of positive batches detected in a row, from the time that the first batch is positive, is characterised by its median and the bounds of its confidence interval at 95%. For example, if *P_d* = 0.6, we will most commonly encounter around 2 successive positive batches, although this number will vary between 1 and 8.*

On observe qu'il faut une probabilité de détection extrêmement élevée (0,98) au niveau d'un lot pour que la borne inférieure de l'intervalle de confiance dépasse 1.

Cette constatation rend assez pessimiste sur la puissance que peuvent apporter les résultats des contrôles de la production finale pour détecter des dérivés. Malgré tout, il faut exploiter au maximum l'information disponible et nous recommandons que les industriels mettent au point, et scrutent à chaque contrôle, des diagrammes de mise en perspective des trajectoires de la qualité de leur production. Pour donner un exemple, nous suggérons quelque chose à l'image de la Figure 12.

Figure 12 : Exemple de suivi graphique de la détection des lots sur une longue période

Figure 12: Example of graphical monitoring of the detection of batches over a long period



Il est important de saisir que ceci est un exemple de réalisation : pour la même configuration des valeurs des paramètres, des contrôles (et donc des courbes) très différents surviennent. La simulation présentée (n°3) est celle d'un comportement « moyen ».

C-3. Exploration systématique des simulations numériques

Il n'est pas possible de reproduire dans un rapport écrit le résultat des 18 225 simulations qui ont été calculées. Dans cette section, nous en donnons un aperçu par le tableau 16 qui en reproduit un peu plus de 3 % et les deux figures 13 et 14 plus synthétiques.

Tableau 16: Présentation d'une partie des résultats des simulations

Table 16: Presentation of some of the simulation results

À chaque ligne de ce tableau correspond une simulation particulière, définie par les six paramètres que nous avons fait varier ($N_c, P_c, N_p, M_p, N_a, P_a$; voir section C-1.7.) qui se trouvent précisés dans les six premières colonnes et la probabilité de détection (P_d) obtenue en dernière colonne.

En première ligne, on peut y lire que la probabilité de détection pour ($M_l = 30\ 000, N_c = 0,1, P_c = 0,02, N_p = 60, M_p = 0,050, N_a = 1, P_a = 1$) vaut 0,258.

To each line of this table corresponds a specific simulation, defined by the six parameters that we varied ($N_c, P_c, N_p, M_p, N_a, P_a$; see section C-1.7) which are specified in the first six columns and the detection probability (P_d) obtained in the last column.

In the first line, it can be read that the detection probability for ($M_l = 30.000, N_c = 0,1, P_c = 0.02, N_p = 60, M_p = 0.050, N_a = 1, P_a = 1$) equals 0.258.

N_c	P_c	N_p	M_p	N_a	P_a	P_d	N_c	P_c	N_p	M_p	N_a	P_a	P_d
0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258	0,01	0,02	60	0,05	1	0,1	0,003
0,001	0,001	60	0,05	1	1	0,003	0,01	0,02	60	0,05	1	0,5	0,016
0,001	0,05	60	0,05	1	1	0,003	0,01	0,02	60	0,05	1	1	0,03
0,001	1	60	0,05	1	1	0,003	0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059
0,001	0,02	10	0,05	1	1	0	0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259
0,001	0,02	60	0,05	1	1	0,003	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,001	0,02	180	0,05	1	1	0,009	0,1	0,02	10	0,05	1	1	0,045
0,001	0,02	60	0,005	1	1	0	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,001	0,02	60	0,05	1	1	0,003	0,1	0,02	180	0,05	1	1	0,59
0,001	0,02	60	0,3	1	1	0,019	0,1	0,02	60	0,005	1	1	0,03
0,001	0,02	60	0,05	1	1	0,003	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,001	0,02	60	0,05	2	1	0,003	0,1	0,02	60	0,3	1	1	0,812
0,001	0,02	60	0,05	5	1	0,003	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,001	0,02	60	0,05	1	0,1	0	0,1	0,02	60	0,05	2	1	0,257
0,001	0,02	60	0,05	1	0,5	0,001	0,1	0,02	60	0,05	5	1	0,258
0,001	0,02	60	0,05	1	1	0,003	0,1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,03
0,01	0,001	60	0,05	1	1	0,024	0,1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,14
0,01	0,05	60	0,05	1	1	0,03	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,01	0,02	10	0,05	1	1	0,005	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,01	0,02	60	0,05	1	1	0,03	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,01	0,02	180	0,05	1	1	0,087	1	0,02	10	0,05	1	1	0,186
0,01	0,02	60	0,005	1	1	0,003	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
0,01	0,02	60	0,05	1	1	0,03	1	0,02	180	0,05	1	1	1
0,01	0,02	60	0,3	1	1	0,165	1	0,02	60	0,005	1	1	0,258

<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>	<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>
0,01	0,02	60	0,05	1	1	0,03	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
0,01	0,02	60	0,05	2	1	0,03	1	0,02	60	0,3	1	1	1
0,01	0,02	60	0,05	5	1	0,03	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
1	0,02	60	0,05	2	1	0,934	0,1	0,02	10	0,005	1	1	0,005
1	0,02	60	0,05	5	1	0,934	0,1	0,02	10	0,05	1	1	0,045
1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,258	0,1	0,02	10	0,3	1	1	0,157
1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,754	0,1	0,02	10	0,05	1	1	0,045
1	0,02	60	0,05	1	1	0,934	0,1	0,02	10	0,05	2	1	0,045
0,1	0,001	10	0,05	1	1	0,01	0,1	0,02	10	0,05	5	1	0,045
0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059	0,1	0,02	10	0,05	1	0,1	0,005
0,1	0,001	180	0,05	1	1	0,177	0,1	0,02	10	0,05	1	0,5	0,024
0,1	0,001	60	0,005	1	1	0,024	0,1	0,02	10	0,05	1	1	0,045
0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059	0,1	0,02	60	0,005	1	1	0,03
0,1	0,001	60	0,3	1	1	0,06	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059	0,1	0,02	60	0,3	1	1	0,812
0,1	0,001	60	0,05	2	1	0,059	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,1	0,001	60	0,05	5	1	0,059	0,1	0,02	60	0,05	2	1	0,257
0,1	0,001	60	0,05	1	0,1	0,024	0,1	0,02	60	0,05	5	1	0,258
0,1	0,001	60	0,05	1	0,5	0,055	0,1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,03
0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059	0,1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,14
0,1	0,05	10	0,05	1	1	0,048	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	0,1	0,02	180	0,005	1	1	0,087
0,1	0,05	180	0,05	1	1	0,59	0,1	0,02	180	0,05	1	1	0,59
0,1	0,05	60	0,005	1	1	0,03	0,1	0,02	180	0,3	1	1	0,994
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	0,1	0,02	180	0,05	1	1	0,59
0,1	0,05	60	0,3	1	1	0,836	0,1	0,02	180	0,05	2	1	0,591
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	0,1	0,02	180	0,05	5	1	0,591
0,1	0,05	60	0,05	2	1	0,26	0,1	0,02	180	0,05	1	0,1	0,087
0,1	0,05	60	0,05	5	1	0,261	0,1	0,02	180	0,05	1	0,5	0,362
0,1	0,05	60	0,05	1	0,1	0,03	0,1	0,02	180	0,05	1	1	0,59
0,1	0,05	60	0,05	1	0,5	0,14	0,1	0,02	60	0,005	1	1	0,03
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	0,1	0,02	60	0,005	2	1	0,03
0,1	1	10	0,05	1	1	0,049	0,1	0,02	60	0,005	5	1	0,03
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	0,02	60	0,005	1	0,1	0,003
0,1	1	180	0,05	1	1	0,595	0,1	0,02	60	0,005	1	0,5	0,016
0,1	1	60	0,005	1	1	0,03	0,1	0,02	60	0,005	1	1	0,03
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,1	1	60	0,3	1	1	0,837	0,1	0,02	60	0,05	2	1	0,257
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	0,02	60	0,05	5	1	0,258
0,1	1	60	0,05	2	1	0,261	0,1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,03

<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>	<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>
0,1	1	60	0,05	5	1	0,26	0,1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,14
0,1	1	60	0,05	1	0,1	0,03	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,1	1	60	0,05	1	0,5	0,141	0,1	0,02	60	0,3	1	1	0,812
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	0,02	60	0,3	2	1	0,812
0,1	0,02	60	0,3	5	1	0,813	0,01	1	60	0,05	1	0,1	0,003
0,1	0,02	60	0,3	1	0,1	0,165	0,01	1	60	0,05	1	0,5	0,015
0,1	0,02	60	0,3	1	0,5	0,579	0,01	1	60	0,05	1	1	0,03
0,1	0,02	60	0,3	1	1	0,812	0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059
0,1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,03	0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259
0,1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,14	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258	0,1	1	10	0,05	1	1	0,049
0,1	0,02	60	0,05	2	0,1	0,03	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,1	0,02	60	0,05	2	0,5	0,139	0,1	1	180	0,05	1	1	0,595
0,1	0,02	60	0,05	2	1	0,257	0,1	1	60	0,005	1	1	0,03
0,1	0,02	60	0,05	5	0,1	0,03	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,1	0,02	60	0,05	5	0,5	0,139	0,1	1	60	0,3	1	1	0,837
0,1	0,02	60	0,05	5	1	0,258	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	1	60	0,05	2	1	0,261
0,001	0,001	60	0,05	1	1	0,003	0,1	1	60	0,05	5	1	0,26
0,001	0,05	60	0,05	1	1	0,003	0,1	1	60	0,05	1	0,1	0,03
0,001	1	60	0,05	1	1	0,003	0,1	1	60	0,05	1	0,5	0,141
0,001	1	10	0,05	1	1	0,001	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,001	1	60	0,05	1	1	0,003	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,001	1	180	0,05	1	1	0,009	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,001	1	60	0,005	1	1	0	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,001	1	60	0,05	1	1	0,003	1	1	10	0,05	1	1	0,393
0,001	1	60	0,3	1	1	0,018	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,001	1	60	0,05	1	1	0,003	1	1	180	0,05	1	1	1
0,001	1	60	0,05	2	1	0,003	1	1	60	0,005	1	1	0,261
0,001	1	60	0,05	5	1	0,003	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,001	1	60	0,05	1	0,1	0	1	1	60	0,3	1	1	1
0,001	1	60	0,05	1	0,5	0,001	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,001	1	60	0,05	1	1	0,003	1	1	60	0,05	2	1	0,95
0,01	0,001	60	0,05	1	1	0,024	1	1	60	0,05	5	1	0,95
0,01	0,05	60	0,05	1	1	0,03	1	1	60	0,05	1	0,1	0,261
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	1	1	60	0,05	1	0,5	0,78
0,01	1	10	0,05	1	1	0,005	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	0,1	0,001	10	0,05	1	1	0,01
0,01	1	180	0,05	1	1	0,086	0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059
0,01	1	60	0,005	1	1	0,003	0,1	0,001	180	0,05	1	1	0,177
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	0,1	0,001	60	0,005	1	1	0,024

<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>	<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>
0,01	1	60	0,3	1	1	0,166	0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	0,1	0,001	60	0,3	1	1	0,06
0,01	1	60	0,05	2	1	0,03	0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059
0,01	1	60	0,05	5	1	0,03	0,1	0,001	60	0,05	2	1	0,059
0,1	0,001	60	0,05	5	1	0,059	0,1	1	60	0,05	2	1	0,261
0,1	0,001	60	0,05	1	0,1	0,024	0,1	1	60	0,05	5	1	0,26
0,1	0,001	60	0,05	1	0,5	0,055	0,1	1	60	0,05	1	0,1	0,03
0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059	0,1	1	60	0,05	1	0,5	0,141
0,1	0,05	10	0,05	1	1	0,048	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	0,1	1	180	0,005	1	1	0,086
0,1	0,05	180	0,05	1	1	0,59	0,1	1	180	0,05	1	1	0,595
0,1	0,05	60	0,005	1	1	0,03	0,1	1	180	0,3	1	1	0,996
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	0,1	1	180	0,05	1	1	0,595
0,1	0,05	60	0,3	1	1	0,836	0,1	1	180	0,05	2	1	0,594
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	0,1	1	180	0,05	5	1	0,594
0,1	0,05	60	0,05	2	1	0,26	0,1	1	180	0,05	1	0,1	0,086
0,1	0,05	60	0,05	5	1	0,261	0,1	1	180	0,05	1	0,5	0,365
0,1	0,05	60	0,05	1	0,1	0,03	0,1	1	180	0,05	1	1	0,595
0,1	0,05	60	0,05	1	0,5	0,14	0,1	1	60	0,005	1	1	0,03
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	0,1	1	60	0,005	2	1	0,03
0,1	1	10	0,05	1	1	0,049	0,1	1	60	0,005	5	1	0,03
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	1	60	0,005	1	0,1	0,003
0,1	1	180	0,05	1	1	0,595	0,1	1	60	0,005	1	0,5	0,015
0,1	1	60	0,005	1	1	0,03	0,1	1	60	0,005	1	1	0,03
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,1	1	60	0,3	1	1	0,837	0,1	1	60	0,05	2	1	0,261
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	1	60	0,05	5	1	0,26
0,1	1	60	0,05	2	1	0,261	0,1	1	60	0,05	1	0,1	0,03
0,1	1	60	0,05	5	1	0,26	0,1	1	60	0,05	1	0,5	0,141
0,1	1	60	0,05	1	0,1	0,03	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,1	1	60	0,05	1	0,5	0,141	0,1	1	60	0,3	1	1	0,837
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	1	60	0,3	2	1	0,834
0,1	1	10	0,005	1	1	0,005	0,1	1	60	0,3	5	1	0,835
0,1	1	10	0,05	1	1	0,049	0,1	1	60	0,3	1	0,1	0,166
0,1	1	10	0,3	1	1	0,258	0,1	1	60	0,3	1	0,5	0,598
0,1	1	10	0,05	1	1	0,049	0,1	1	60	0,3	1	1	0,837
0,1	1	10	0,05	2	1	0,05	0,1	1	60	0,05	1	0,1	0,03
0,1	1	10	0,05	5	1	0,05	0,1	1	60	0,05	1	0,5	0,141
0,1	1	10	0,05	1	0,1	0,005	0,1	1	60	0,05	1	1	0,261
0,1	1	10	0,05	1	0,5	0,025	0,1	1	60	0,05	2	0,1	0,03
0,1	1	10	0,05	1	1	0,049	0,1	1	60	0,05	2	0,5	0,139

<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>	<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>
0,1	1	60	0,005	1	1	0,03	0,1	1	60	0,05	2	1	0,261
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	1	60	0,05	5	0,1	0,03
0,1	1	60	0,3	1	1	0,837	0,1	1	60	0,05	5	0,5	0,141
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	0,1	1	60	0,05	5	1	0,26
1	0,02	60	0,05	1	1	0,934	0,1	0,02	60	0,05	2	1	0,257
0,001	0,001	60	0,05	1	1	0,003	0,1	0,02	60	0,05	5	1	0,258
0,001	0,05	60	0,05	1	1	0,003	0,1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,03
0,001	1	60	0,05	1	1	0,003	0,1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,14
0,001	0,02	10	0,05	1	1	0	0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258
0,001	0,02	60	0,05	1	1	0,003	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,001	0,02	180	0,05	1	1	0,009	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,001	0,02	60	0,005	1	1	0	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,001	0,02	60	0,05	1	1	0,003	1	0,02	10	0,05	1	1	0,186
0,001	0,02	60	0,3	1	1	0,019	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
0,001	0,02	60	0,05	1	1	0,003	1	0,02	180	0,05	1	1	1
0,001	0,02	60	0,05	2	1	0,003	1	0,02	60	0,005	1	1	0,258
0,001	0,02	60	0,05	5	1	0,003	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
0,001	0,02	60	0,05	1	0,1	0	1	0,02	60	0,3	1	1	1
0,001	0,02	60	0,05	1	0,5	0,001	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
0,001	0,02	60	0,05	1	1	0,003	1	0,02	60	0,05	2	1	0,934
0,01	0,001	60	0,05	1	1	0,024	1	0,02	60	0,05	5	1	0,934
0,01	0,05	60	0,05	1	1	0,03	1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,258
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,754
0,01	0,02	10	0,05	1	1	0,005	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
0,01	0,02	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	10	0,05	1	1	0,01
0,01	0,02	180	0,05	1	1	0,087	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,01	0,02	60	0,005	1	1	0,003	1	0,001	180	0,05	1	1	0,179
0,01	0,02	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	60	0,005	1	1	0,059
0,01	0,02	60	0,3	1	1	0,165	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,01	0,02	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	60	0,3	1	1	0,06
0,01	0,02	60	0,05	2	1	0,03	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,01	0,02	60	0,05	5	1	0,03	1	0,001	60	0,05	2	1	0,06
0,01	0,02	60	0,05	1	0,1	0,003	1	0,001	60	0,05	5	1	0,06
0,01	0,02	60	0,05	1	0,5	0,016	1	0,001	60	0,05	1	0,1	0,059
0,01	0,02	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	60	0,05	1	0,5	0,06
0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	1	0,05	10	0,05	1	1	0,318
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,1	0,02	10	0,05	1	1	0,045	1	0,05	180	0,05	1	1	1
0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258	1	0,05	60	0,005	1	1	0,259
0,1	0,02	180	0,05	1	1	0,59	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95

N_c	P_c	N_p	M_p	N_a	P_a	P_d	N_c	P_c	N_p	M_p	N_a	P_a	P_d
0,1	0,02	60	0,005	1	1	0,03	1	0,05	60	0,3	1	1	1
0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,1	0,02	60	0,3	1	1	0,812	1	0,05	60	0,05	2	1	0,951
0,1	0,02	60	0,05	1	1	0,258	1	0,05	60	0,05	5	1	0,951
1	0,05	60	0,05	1	0,1	0,259	1	0,02	180	0,05	1	1	1
1	0,05	60	0,05	1	0,5	0,778	1	0,02	60	0,005	1	1	0,258
1	0,05	60	0,05	1	1	0,95	1	0,02	60	0,005	2	1	0,257
1	1	10	0,05	1	1	0,393	1	0,02	60	0,005	5	1	0,258
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	0,02	60	0,005	1	0,1	0,03
1	1	180	0,05	1	1	1	1	0,02	60	0,005	1	0,5	0,14
1	1	60	0,005	1	1	0,261	1	0,02	60	0,005	1	1	0,258
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
1	1	60	0,3	1	1	1	1	0,02	60	0,05	2	1	0,934
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	0,02	60	0,05	5	1	0,934
1	1	60	0,05	2	1	0,95	1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,258
1	1	60	0,05	5	1	0,95	1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,754
1	1	60	0,05	1	0,1	0,261	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
1	1	60	0,05	1	0,5	0,78	1	0,02	60	0,3	1	1	1
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	0,02	60	0,3	2	1	1
1	0,02	10	0,005	1	1	0,045	1	0,02	60	0,3	5	1	1
1	0,02	10	0,05	1	1	0,186	1	0,02	60	0,3	1	0,1	0,812
1	0,02	10	0,3	1	1	0,201	1	0,02	60	0,3	1	0,5	0,999
1	0,02	10	0,05	1	1	0,186	1	0,02	60	0,3	1	1	1
1	0,02	10	0,05	2	1	0,186	1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,258
1	0,02	10	0,05	5	1	0,186	1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,754
1	0,02	10	0,05	1	0,1	0,045	1	0,02	60	0,05	1	1	0,934
1	0,02	10	0,05	1	0,5	0,144	1	0,02	60	0,05	2	0,1	0,257
1	0,02	10	0,05	1	1	0,186	1	0,02	60	0,05	2	0,5	0,755
1	0,02	60	0,005	1	1	0,258	1	0,02	60	0,05	2	1	0,934
1	0,02	60	0,05	1	1	0,934	1	0,02	60	0,05	5	0,1	0,258
1	0,02	60	0,3	1	1	1	1	0,02	60	0,05	5	0,5	0,756
1	0,02	60	0,05	1	1	0,934	1	0,02	60	0,05	5	1	0,934
1	0,02	60	0,05	2	1	0,934	1	1	60	0,05	1	1	0,95
1	0,02	60	0,05	5	1	0,934	0,001	0,001	60	0,05	1	1	0,003
1	0,02	60	0,05	1	0,1	0,258	0,001	0,05	60	0,05	1	1	0,003
1	0,02	60	0,05	1	0,5	0,754	0,001	1	60	0,05	1	1	0,003
1	0,02	60	0,05	1	1	0,934	0,001	1	10	0,05	1	1	0,001
1	0,02	180	0,005	1	1	0,59	0,001	1	60	0,05	1	1	0,003
1	0,02	180	0,05	1	1	1	0,001	1	180	0,05	1	1	0,009
1	0,02	180	0,3	1	1	1	0,001	1	60	0,005	1	1	0
1	0,02	180	0,05	1	1	1	0,001	1	60	0,05	1	1	0,003

<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>	<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>
1	0,02	180	0,05	2	1	1	0,001	1	60	0,3	1	1	0,018
1	0,02	180	0,05	5	1	1	0,001	1	60	0,05	1	1	0,003
1	0,02	180	0,05	1	0,1	0,59	0,001	1	60	0,05	2	1	0,003
1	0,02	180	0,05	1	0,5	0,986	0,001	1	60	0,05	5	1	0,003
0,001	1	60	0,05	1	0,1	0	1	1	60	0,3	1	1	1
0,001	1	60	0,05	1	0,5	0,001	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,001	1	60	0,05	1	1	0,003	1	1	60	0,05	2	1	0,95
0,01	0,001	60	0,05	1	1	0,024	1	1	60	0,05	5	1	0,95
0,01	0,05	60	0,05	1	1	0,03	1	1	60	0,05	1	0,1	0,261
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	1	1	60	0,05	1	0,5	0,78
0,01	1	10	0,05	1	1	0,005	1	1	60	0,05	1	1	0,95
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	10	0,05	1	1	0,01
0,01	1	180	0,05	1	1	0,086	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,01	1	60	0,005	1	1	0,003	1	0,001	180	0,05	1	1	0,179
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	60	0,005	1	1	0,059
0,01	1	60	0,3	1	1	0,166	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	60	0,3	1	1	0,06
0,01	1	60	0,05	2	1	0,03	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,01	1	60	0,05	5	1	0,03	1	0,001	60	0,05	2	1	0,06
0,01	1	60	0,05	1	0,1	0,003	1	0,001	60	0,05	5	1	0,06
0,01	1	60	0,05	1	0,5	0,015	1	0,001	60	0,05	1	0,1	0,059
0,01	1	60	0,05	1	1	0,03	1	0,001	60	0,05	1	0,5	0,06
0,1	0,001	60	0,05	1	1	0,059	1	0,001	60	0,05	1	1	0,06
0,1	0,05	60	0,05	1	1	0,259	1	0,05	10	0,05	1	1	0,318
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,1	1	10	0,05	1	1	0,049	1	0,05	180	0,05	1	1	1
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	1	0,05	60	0,005	1	1	0,259
0,1	1	180	0,05	1	1	0,595	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,1	1	60	0,005	1	1	0,03	1	0,05	60	0,3	1	1	1
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,1	1	60	0,3	1	1	0,837	1	0,05	60	0,05	2	1	0,951
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	1	0,05	60	0,05	5	1	0,951
0,1	1	60	0,05	2	1	0,261	1	0,05	60	0,05	1	0,1	0,259
0,1	1	60	0,05	5	1	0,26	1	0,05	60	0,05	1	0,5	0,778
0,1	1	60	0,05	1	0,1	0,03	1	0,05	60	0,05	1	1	0,95
0,1	1	60	0,05	1	0,5	0,141	1	1	10	0,05	1	1	0,393
0,1	1	60	0,05	1	1	0,261	1	1	60	0,05	1	1	0,95
1	0,001	60	0,05	1	1	0,06	1	1	180	0,05	1	1	1
1	0,05	60	0,05	1	1	0,95	1	1	60	0,005	1	1	0,261
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	1	60	0,05	1	1	0,95
1	1	10	0,05	1	1	0,393	1	1	60	0,3	1	1	1

<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>	<i>N_c</i>	<i>P_c</i>	<i>N_p</i>	<i>M_p</i>	<i>N_a</i>	<i>P_a</i>	<i>P_d</i>
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	1	60	0,05	1	1	0,95
1	1	180	0,05	1	1	1	1	1	60	0,05	2	1	0,95
1	1	60	0,005	1	1	0,261	1	1	60	0,05	5	1	0,95
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	1	60	0,05	1	0,1	0,261
1	1	60	0,05	1	0,5	0,78	1	1	60	0,005	1	1	0,261
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	1	60	0,005	2	1	0,261
1	1	10	0,005	1	1	0,049	1	1	60	0,005	5	1	0,26
1	1	10	0,05	1	1	0,393	1	1	60	0,005	1	0,1	0,03
1	1	10	0,3	1	1	0,95	1	1	60	0,005	1	0,5	0,141
1	1	10	0,05	1	1	0,393	1	1	60	0,005	1	1	0,261
1	1	10	0,05	2	1	0,394	1	1	60	0,05	1	1	0,95
1	1	10	0,05	5	1	0,395	1	1	60	0,05	2	1	0,95
1	1	10	0,05	1	0,1	0,049	1	1	60	0,05	5	1	0,95
1	1	10	0,05	1	0,5	0,221	1	1	60	0,05	1	0,1	0,261
1	1	10	0,05	1	1	0,393	1	1	60	0,05	1	0,5	0,78
1	1	60	0,005	1	1	0,261	1	1	60	0,05	1	1	0,95
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	1	60	0,3	1	1	1
1	1	60	0,3	1	1	1	1	1	60	0,3	2	1	1
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	1	60	0,3	5	1	1
1	1	60	0,05	2	1	0,95	1	1	60	0,3	1	0,1	0,837
1	1	60	0,05	5	1	0,95	1	1	60	0,3	1	0,5	1
1	1	60	0,05	1	0,1	0,261	1	1	60	0,3	1	1	1
1	1	60	0,05	1	0,5	0,78	1	1	60	0,05	1	0,1	0,261
1	1	60	0,05	1	1	0,95	1	1	60	0,05	1	0,5	0,78
1	1	180	0,005	1	1	0,595	1	1	60	0,05	1	1	0,95
1	1	180	0,05	1	1	1	1	1	60	0,05	2	0,1	0,261
1	1	180	0,3	1	1	1	1	1	60	0,05	2	0,5	0,776
1	1	180	0,05	1	1	1	1	1	60	0,05	2	1	0,95
1	1	180	0,05	2	1	1	1	1	60	0,05	5	0,1	0,26
1	1	180	0,05	5	1	1	1	1	60	0,05	5	0,5	0,776
1	1	180	0,05	1	0,1	0,595	1	1	60	0,05	5	1	0,95
1	1	180	0,05	1	0,5	0,989							
1	1	180	0,05	1	1	1							

Figure 13: P_d comme fonction de N_p et N_c

Figure 13: P_d as a function of N_p and N_c

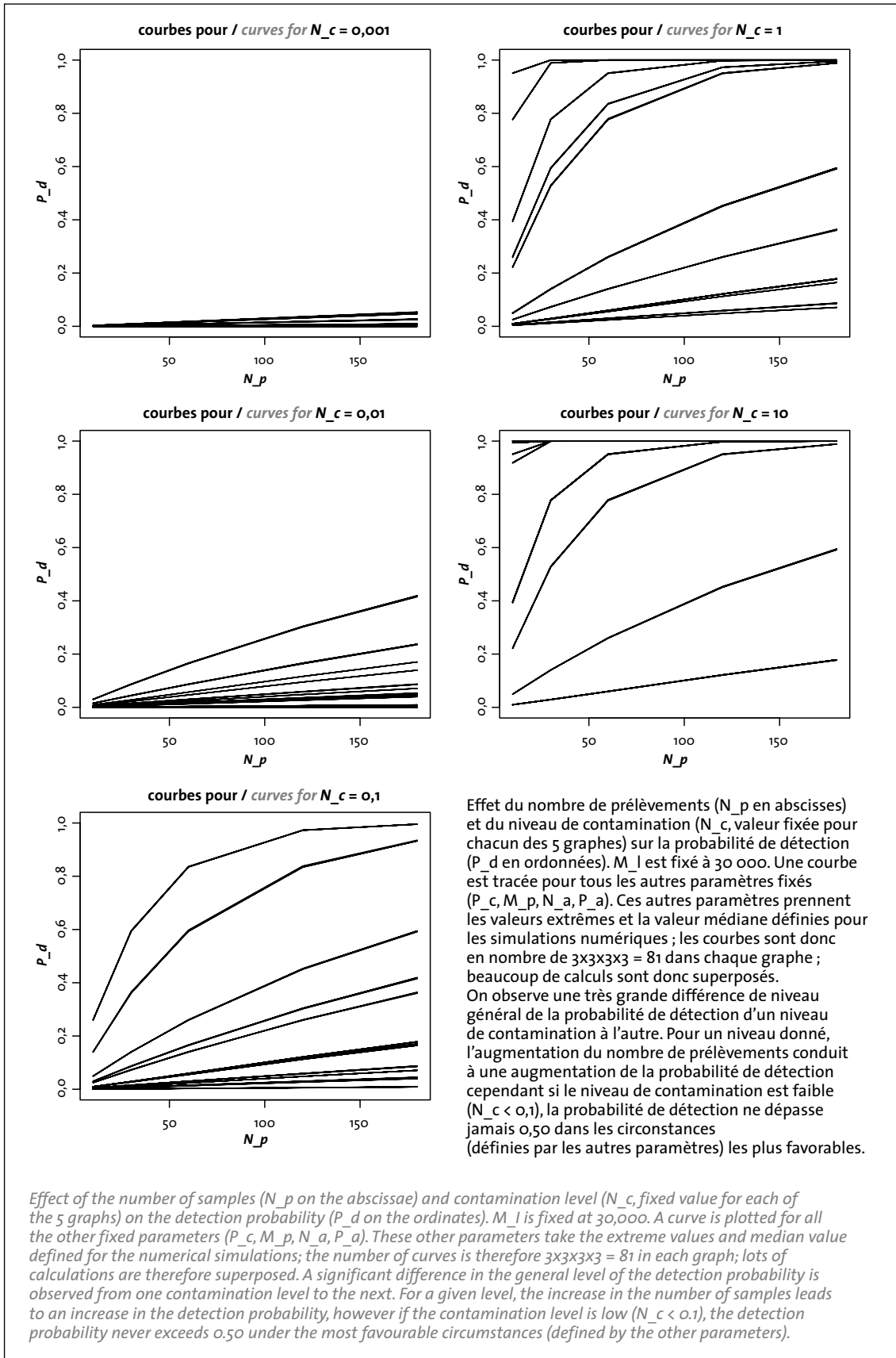
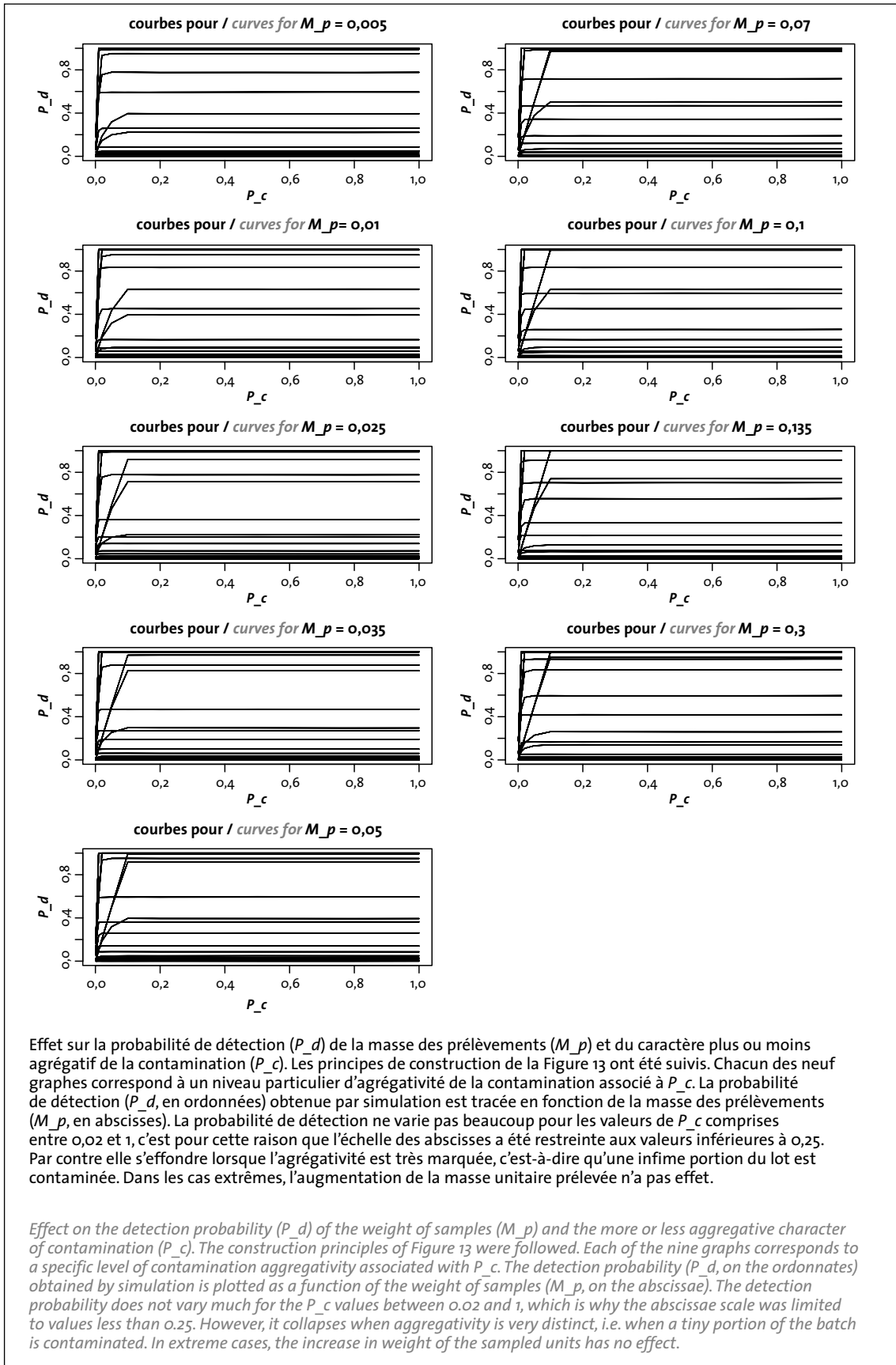


Figure 14: P_d comme fonction de M_p et P_c

Figure 14: P_d as a function of M_p and P_c



Les principaux faits qui se dégagent des figures 13 et 14, sont :

- l'effet du niveau de contamination (N_c) est notable et le plus important ;
- comparativement, l'effet d'agrégativité est bien moindre et ne se manifeste que pour les taux d'agrégation extrêmes ($P_c < 0,02$) ;
- l'effet regroupement (N_a) est nul (et pour cause, voir point C-1.4) ;
- l'effet de la proportion analysée (P_a) est très faible (sans doute conséquence de l'homogénéisation réalisée qui permet malgré tout une bonne exploration des points prélevés du lot) ;
- l'effet de la masse prélevée est fort : un contraste est visible sur la figure entre 0,035 et 0,070 kg ;
- est également, approximativement au même niveau sur la gamme étudiée, l'effet du nombre de prélèvements ; si une coupure devait être faite, elle le serait entre 30 et 60 prélèvements.

Bien sûr ces observations dépendent du domaine des paramètres exploré dans les calculs et ne peuvent pas être extrapolées sans vérification numérique supplémentaire à la situation concrète envisagée.

Les membres du groupe ont cherché à décrire et à comprendre :

- le fonctionnement d'une usine de fabrication de préparations déshydratées en poudre, notamment pour ce qui concerne l'hygiène, en mettant l'accent sur les étapes critiques du procédé « type », notamment la surveillance de l'environnement dans l'atelier ;
- les méthodes d'analyse disponibles pour déterminer les contaminations par les *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* et *E. sakazakii*, notamment pour ce qui concerne les limites et l'interprétation des résultats ;
- l'efficacité des plans d'échantillonnage, notamment pour ce qui concerne les très faibles concentrations des bactéries recherchées (par exemple ≤ 1 bactérie par kilogramme) ainsi que les situations où la répartition de la contamination est hétérogène.

Ce travail s'est appuyé sur l'expérience et la connaissance des professionnels du secteur. La visite d'une usine puis des auditions de personnes compétentes appartenant à des entreprises françaises et multinationales ont grandement aidé le groupe de travail.

D-1. Hygiène de la fabrication

Il ressort de la description du procédé de fabrication des aliments visés par la saisine que les lignes de fabrication se subdivisent en deux parties nettement distinctes et séparées. La deuxième partie présente des difficultés particulières quant au maintien de l'hygiène.

La **première partie** des lignes de fabrications se termine par une étape assainissante (la pasteurisation en écoulement continu dans des échangeurs de chaleur), et utilise des équipements qui peuvent être nettoyés et désinfectés sans démontage (NEP, nettoyage en place). Cette co-existence de la pasteurisation et du NEP, combinée à une rigoureuse hygiène du personnel, fait que cette première partie ne présente pas de problème d'hygiène non maîtrisable pour les bactéries étudiées ici.

Dans la **deuxième partie** des lignes de fabrication, celle où l'aliment est déshydraté, le produit final (la poudre) est la plupart du temps exposé à l'air libre dans l'usine jusqu'à la fermeture de son conditionnement. Le maintien d'une hygrométrie aussi basse que possible, l'élimination à sec des poussières, la lutte contre les nuisibles (rongeurs,

The group members sought to describe and understand:

- *how a factory making dried powdered formulae operates, and in particular how hygiene is taken into account in its day-to-day running, by focusing on the critical steps of the «standard» process, especially environmental monitoring in the workshop;*
- *the available analytical methods for determining contamination by Enterobacteriaceae, Salmonella and E. sakazakii, particularly as regards the limits and interpretation of results;*
- *the effectiveness of sampling plans, particularly as regards the very low concentrations of the bacteria being sought (e.g. ≤ 1 bacterium per kg) and the situations in which contamination distribution is heterogeneous.*

This work draws on the experience and knowledge of professionals in the sector. The factory visit and hearings of competent people from French and multinational companies proved invaluable to the working group.

D-1. Production hygiene

The description of the production process for the foods addressed by the request states that the production lines are subdivided into two clearly distinct, separate parts. The second part presents particular difficulties in terms of hygiene maintenance.

*The **first part** of the production lines ends with a decontamination step (pasteurisation with continuous flow in heat exchangers) and uses equipment that can be cleaned and disinfected without being dismantled (cleaning in place/CIP). The co-existence of pasteurisation and CIP, combined with rigorous staff hygiene, means that the first part of the production lines does not pose any uncontrollable hygiene problems as regards the bacteria studied here.*

*In the **second part** of the production lines, where the food is dried, the end product (the powder) is usually exposed to the air in the factory until being sealed in its packaging. Maintenance of as low a hygrometry as possible; dry elimination of dust particles; pest control (rodents, insects, birds, etc.); treated air supply; staff intervention, qualification, clothing and techniques; zoning for air circulation and staff movements must comply with strict rules. Water must not be used routinely for cleaning and disinfection as, in this part of the factory, humidity fosters proliferation*

insectes, oiseaux, etc.), l'alimentation en air traité, la fréquence, l'habilitation, la tenue et la gestuelle des personnels, le zonage pour la circulation de l'air et des personnels doivent obéir à des règles strictes. L'eau ne doit pas être utilisée en routine pour le nettoyage et la désinfection car, dans cette partie des usines, l'humidité favorise la prolifération des contaminants microbiens : l'eau ne peut servir que lors de « grands nettoyages » faits à faible fréquence dans l'année. En l'absence d'autorisation d'utilisation de procédés permettant d'assainir le produit final, il est essentiel que le statut microbiologique de l'environnement de cette partie de l'usine soit maîtrisé et surveillé avec le plus grand soin. En outre, tout ingrédient incorporé à la poudre doit obéir aux mêmes exigences microbiologiques que celle-ci.

Dans certains procédés, le produit déshydraté doit être mélangé avec un **additif humide** (ex. la lécithine). Il importe que les caractéristiques microbiologiques de l'additif ne dégradent pas celles du produit déshydraté, et que des précautions soient prises pour que les parties humides de l'équipement de mélangeage soient maintenues dans un état hygiénique irréprochable. Les usines où cette opération est pratiquée présentent un risque sanitaire accru nécessitant une surveillance particulièrement stricte.

La nécessité de **surveiller avec rigueur l'hygiène de l'environnement de fabrication** dans la deuxième partie des lignes de fabrication est connue depuis longtemps (Burgess and the Group D44 1994). La recherche des *Enterobacteriaceae* a été mise en place à cette fin. Elle a conduit au cours des ans à renforcer les mesures de maîtrise de l'hygiène au point qu'aujourd'hui *Salmonella* n'est plus détecté dans le produit fini, provenant d'usines présentant un niveau élevé de maîtrise sanitaire.

Dans certaines usines, *Salmonella* est cherché dans l'environnement comme organisme indicateur d'hygiène de procédé en complément des *Enterobacteriaceae*, indicateur figurant dans le règlement (CE) n° 2073/2005.

Malheureusement, des incidents récents ont montré que des contaminations ponctuelles de l'environnement peuvent contaminer les produits. Un haut niveau de vigilance reste requis et ce, de façon permanente.

Les inquiétudes soulevées par l'isolement d'*E. sakazakii* depuis quelques années ont conduit à mieux connaître l'écologie de cette espèce bactérienne ubiquitaire. La plupart des exploitants ont appris à surveiller les points humides, où elle est le plus susceptible de se développer et d'où elle peut être transportée par l'air et les personnes dans la partie sèche de la ligne de fabrication. Elle peut donc aussi être utilisée dans les usines comme organisme indicateur d'hygiène de procédé en complément des *Enterobacteriaceae*.

of microbial contaminants: water may only be used during "major cleaning operations" carried out only occasionally through the year. With no authorisation to use processes to clean the end product, it is essential that the microbiological status of the environment in this part of the factory is controlled and monitored with the utmost attention. Moreover, any ingredient incorporated in the powder must meet the same microbiological requirements as the powder.

*In some processes, the dried product needs to be mixed with a **wet additive** (e.g. lecithin). It is important that the microbiological characteristics of the additive do not damage those of the dried product, and that precautions are taken to ensure that the wet parts of the mixing equipment are kept in an irreproachable state of hygiene. The factories where this operation is practised poses a major health risk requiring particularly strict monitoring.*

*The need for **rigorous hygiene monitoring of the production environment** in the second part of the production line has been known for a long time (Burgess and the Group D44 1994). Enterobacteriaceae searches were set up for this purpose. Over the years, it led to a reinforcement of the hygiene control measures, to the extent that Salmonella is no longer detected in finished products issued from factories with a high level of health control.*

In some factories, Salmonella is sought in the environment as an indicator organism of process hygiene, together with Enterobacteriaceae, which features as an indicator in Regulation (EC) No 2073/2005.

Unfortunately, the recent incidents have shown that occasional environmental contamination can contaminate products. A high level of vigilance is required on a permanent basis.

*The concerns raised by the isolation of *E. sakazakii* over the last few years have improved knowledge about the ecology of this ubiquitous bacterium. Most operators have learnt to monitor humid zones, where it is most likely to develop and where it can be carried by the air and people to the dry part of the production line. It can therefore be used in factories as an indicator organism of process hygiene, together with Enterobacteriaceae.*

This all clearly highlights the importance of control measures to ensure compliance with microbiological criteria of the finished products.

Ce qui précède fait clairement apparaître l'importance des mesures de maîtrise pour assurer le respect des critères microbiologiques des produits finis.

D-2. Méthodes d'analyse

Il a été jugé utile de préciser et de rappeler les définitions des termes et expressions utilisés pour les méthodes d'analyse et leur validation, en s'appuyant sur la normalisation internationale.

Un contraste frappant caractérise l'offre de méthodes d'analyse: offre limitée pour les *Enterobacteriaceae*, pléthorique pour *Salmonella*, balbutiante pour *E. sakazakii*. L'étude des méthodes disponibles pour *Salmonella* a donné l'occasion au groupe de travail de mettre en évidence un certain nombre de problèmes.

D-2.1. Validation des méthodes alternatives

Le règlement (CE) n° 2073/2005 précise quelles méthodes normalisées sont partie intégrante des critères microbiologiques. Toutefois, son article 5.5, indique que « *le recours à d'autres méthodes d'analyse est autorisé lorsque les méthodes sont validées par rapport à la méthode de référence définie à l'annexe I et, s'il s'agit de méthodes commercialisées, certifiées par une tierce partie, conformément au protocole défini dans la norme EN/ISO 16140 ou à d'autres protocoles analogues reconnus au niveau international* ».

Les membres du groupe de travail ont noté que la norme NF EN ISO 16140 et les autres protocoles reconnus au niveau international ne sont pas équivalents. Cette norme et ces protocoles évoluent. De ce fait, les méthodes demeurent valides, en attente de la reconduction de leur validation, alors même que les exigences de validation peuvent avoir évolué (référentiel de validation, méthodes de référence). Ceci est inévitable et inhérent à tout système de certification. Il est souhaitable que la norme fixe des valeurs numériques minimales pour les paramètres caractéristiques des méthodes, pour servir de bases objectives à l'obtention d'un consensus lors de la validation. Des tableaux présentés dans ce rapport n'avaient pas été établis jusqu'ici. Ceux-ci présentent les critères de performances des méthodes alternatives de détection des *Salmonella*, validées par comparaison avec la méthode de référence, indépendamment les unes des autres. En effet, les essais ont été faits avec des matrices alimentaires différentes et ayant des statuts microbiologiques différents. Ce travail de synthèse devrait être publié de façon systématique à l'initiative de l'organisme de validation.

D-2. Analytical methods

It has been considered useful to specify and recall the definitions of the terms and expressions used for analytical methods and their validation on the basis of international standardisation.

There is a striking contrast in the availability of analytical methods: limited availability for Enterobacteriaceae, abundant for Salmonella and in its infancy for E. sakazakii. The study of available methods for Salmonella gave the working group the opportunity to reveal a certain number of problems.

D-2.1. Validation of alternative methods

Regulation (EC) No 2073/2005 stipulates which standardised methods form an integral part of the microbiological criteria. However, Article 5.5 indicates: "The use of alternative analytical methods is acceptable when the methods are validated against the reference method in Annex I and if a proprietary method, certified by a third party in accordance with the protocol set out in EN/ISO standard 16140 or other internationally accepted protocols, is used."

The working group members noted that standard NF EN ISO 16140 and other internationally accepted protocols are not equivalent. This standard and these protocols are evolving. As a result, the methods remain valid, pending a renewal of their validation, even when the validation requirements may have evolved (validation reference standard, reference methods). This is inevitable and inherent in any certification system. It is preferable that the standard sets the minimum numerical values for characteristic parameters of the methods, to act as objective bases for obtaining consensus during validation. The tables presented in this report had not been drawn up until now. They present the performance criteria of alternative methods for detecting Salmonella, validated independently of each other against the reference method. Indeed, the tests were carried out with different food matrices and different microbiological statuses. This summary work should be published systematically at the initiative of the validation body.

Validation protocols focus on the "horizontal" use of methods and are consequently not specific to a single food matrix, such as powdered formulae. Moreover, very few dried powdered formulae have been tested among the matrices used for this validation. This is why laboratories may be prompted to use other methods to look for germs. This possibility should not be rejected, provided that it is justified by the laboratory.

Les protocoles de validation visent l'utilisation « horizontale » des méthodes, elles ne sont donc pas spécifiques à une matrice alimentaire unique, telles que les préparations en poudre et de plus très peu de préparations déshydratées en poudre ont été testées parmi les matrices utilisées pour cette validation. C'est pourquoi, les laboratoires peuvent être amenés à utiliser d'autres méthodes pour rechercher les germes. Cette possibilité ne doit pas être rejetée, sous réserve qu'elle soit justifiée par le laboratoire.

D-2.2. Regroupement (« pooling ») des prises d'essais avant analyse

Une pratique commune dans les laboratoires consiste à regrouper (« pooler ») les prises d'essai. Si la sensibilité (proportion des résultats positifs parmi l'ensemble des prises d'essais réellement positives) et la spécificité (proportion des résultats négatifs parmi l'ensemble des prises d'essais réellement négatives) de la méthode ne sont pas affectées par le regroupement, celui-ci présente l'avantage de réduire considérablement le nombre et donc le coût des analyses, sans nuire à la confiance que l'on peut accorder au résultat. En revanche dans le cas contraire, la signification des résultats d'analyse est affectée.

Le regroupement, couramment pratiqué et documenté pour la recherche de *Salmonella*, est parfois utilisé pour l'analyse de *Enterobacteriaceae* et d'*E. sakazakii*. Ni les experts interrogés, ni les membres du groupe de travail, n'ont d'information sur l'influence de ces pratiques sur la qualité des résultats pour l'analyse de *Enterobacteriaceae* et d'*E. sakazakii*. À ce jour, les commissions de normalisation des méthodes d'analyse microbiologique des aliments au CEN comme à l'ISO ne prévoient pas de normaliser l'étude de l'effet du regroupement. Le groupe de travail encourage les organismes de normalisation à le faire.

D-2.3. Interprétation des résultats positifs obtenus par amplification en chaîne par polymérase (PCR) (voir le logigramme présenté en section B-4.2)

Les membres du groupe de travail notent que cette méthode détecte la présence de matériel nucléaire sans pouvoir déterminer l'état physiologique des cellules. Après enrichissement, une détection par PCR peut aussi bien être causée par la présence d'un nombre détectable de bactéries mortes que par la présence de bactéries s'étant multipliées pendant l'enrichissement. La PCR fournit donc une présomption de présence du danger étudié, plus ou moins forte selon les informations sur le contexte épidémiologique et sur l'hygiène de l'usine et/ou du produit. Ceci s'applique aussi aux résultats des

D-2.2. Compositing of samples before analysis

A common practice in laboratories is to composite samples. If the sensitivity (proportion of positive results among all of the true-positive samples) and the specificity (proportion of negative results among all of the true-negative samples) of the method are not affected by grouping, it presents the advantage of considerably reducing the number and therefore the cost of analyses, without breaching the confidence we can have in the result. However, in the opposite case, the signification of the analysis results is affected.

Compositing, commonly practised and documented for Salmonella searches, is sometimes used to analyse Enterobacteriaceae and E. sakazakii. Neither the experts questioned nor the working group members have information on the influence of these practices on the quality of the Enterobacteriaceae and E. sakazakii analysis results. To date, neither of the food microbiological analysis method standardisation committees at the CEN or ISO plan to standardise the study of the compositing effect. The working group is encouraging standardisation organisations to do so.

D-2.3. Interpretation of the positive results obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification (see the logical diagram presented in B-4.2)

*The working group members note that this method detects the presence of nucleic material without being able to determine the physiological state of cells. After enrichment, detection by PCR can just as likely be caused by the presence of a detectable number of dead bacteria as by the presence of bacteria which multiplied during enrichment. PCR therefore gives a **presumption** of the presence of the hazard studied, which varies depending on what is known of the epidemiological context and factory and/or product hygiene. This also applies to the results of analyses conducted using immunoenzymatic techniques: which only indicate a **presumption**. It should be remembered that only the isolation of cells multiplying on a culture medium confirms the presence of a hazard. A methodological development based on the detection of viability markers might change this conclusion.*

analyses faites au moyen de techniques immuno-enzymatiques : ils n'indiquent qu'une présomption. Il convient de garder en mémoire que seul l'isolement de cellules se multipliant sur milieu de culture apporte une certitude sur la présence du danger. Un développement méthodologique basé sur la détection de marqueurs de viabilité pourrait changer cette conclusion.

D-3. Échantillonnage

En se basant sur des données publiées, le rapport de la consultation FAO/OMS (FAO/WHO 2006)⁽³⁶⁾ classe les lots de préparations déshydratées en poudre en trois catégories où la concentration d'*E. sakazakii* est :

1. < 1 bactérie/100 kg;
2. < 1 bactérie/10 kg;
3. < 1 bactérie/kg.

Dans les entreprises auditionnées par les membres du groupe de travail qui disposaient d'informations organisées, la situation pour *E. sakazakii* est la suivante : usines A et C : respectivement 3 par 10 kg et 1,5 par 10 kg, usines de l'entreprise B : < 0,001 à 0,5 par 10 kg.

Concernant *Salmonella*, leur situation est la suivante :

- A. absence depuis cinq ans dans le produit ;
- B. absence depuis cinq ans dans l'environnement et dans le produit ;
- C. absence dans l'environnement et dans le produit depuis vingt ans.

Ces informations ont été fournies à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Anonyme 2007)⁽³⁷⁾.

On voit que ces entreprises maîtrisent toutes *Salmonella* et qu'elles sont classées en catégorie 2 ou 3 du point de vue de la contamination par *E. sakazakii* estimée.

D-3. Sampling

Based on the data published, the FAO/WHO consultation report (FAO/WHO 2006)⁽³⁶⁾ lists the batches of dried powdered formulae in three different categories, where the concentration of *E. sakazakii* is:

1. < 1 bacterium/100kg;
2. < 1 bacterium/10 kg;
3. < 1 bacterium/kg.

In the companies heard by the working group members who had organised information, the situation for *E. sakazakii* is as follows: factories A and C: 3 per 10kg and 1.5 per 10kg respectively, factories of company B: < 0.001 to 0.5 per 10kg.

Concerning *Salmonella*, their situation is as follows:

- A. absence for five years in the product;
- B. absence for five years in the environment and the product;
- C. absence in the environment and the product for twenty years.

This information was supplied by the European Food Safety Authority (Anonyme 2007)⁽³⁷⁾.

We note that all these companies control *Salmonella* and are listed in category 2 or 3 as regards the estimated contamination by *E. sakazakii*.

(36) FAO/WHO Expert meeting on *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0707e/a0707e00.pdf>, consulté le 2007-03-04.

(37) Tableau 1, page 10 du document « Scientific opinion of BIOHAZ Panel on the request from the Commission for review of the opinion on microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae with regard to *Enterobacteriaceae* as indicators ». Question No EFSA-Q-2006-078, adopted on 24-25 January 2007.

(36) FAO/WHO Expert meeting on *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0707e/a0707e00.pdf>, consulted on 2007-03-04.

(37) Table 1, page 10 of the document "Scientific opinion of BIOHAZ Panel on the request from the Commission for review of the opinion on microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae with regard to *Enterobacteriaceae* as indicators". Question No EFSA-Q-2006-078, adopted on 24-25 January 2007.

D-3.1. *Salmonella*

S'agissant de la pertinence du critère de sécurité des aliments pour *Salmonella*, un lot ne respectant pas le critère microbiologique du règlement (CE) n° 2073/2005 peut contenir $\geq 1,36$ *Salmonella*/kg (intervalle de confiance 95 % : 1,9 par 10 kg à 9,6 par kg) (nombre le plus probable⁽³⁸⁾ calculé avec MPN Calculator (Build 23)⁽³⁹⁾ pour le plan d'échantillonnage « absence dans 30 prises d'essai de 25 g »). Cette valeur est vraisemblablement supérieure de plus de dix fois à celle caractérisant la production des usines citées ci-dessus, puisque ce danger y est resté indétecté depuis des années. Pour cette raison, rechercher ce danger microbien dans l'environnement et le produit peut sembler vain.

Pourtant, il reste utile de maintenir une surveillance car la détection de *Salmonella* serait vraisemblablement le signe d'une contamination accidentelle, comme celle qui s'est produite en France en 2005, pouvant avoir des conséquences sanitaires sur toutes les catégories de consommateur. On sait par ailleurs que l'abandon d'une mesure de surveillance ou de vérification peut s'avérer néfaste. Les crises sanitaires récentes militent en faveur du **maintien d'un critère microbiologique** de sécurité des aliments pour *Salmonella*.

D-3.2. *E. sakazakii*

Dans la version du 15 novembre 2005, le règlement (CE) n° 2073/2005 impose un critère microbiologique de sécurité des aliments pour *E. sakazakii* uniquement lorsque le critère d'hygiène de procédé relatif aux *Enterobacteriaceae* n'est pas respecté⁽⁴⁰⁾. Le raisonnement implicite du législateur est donc qu'il existe un ratio constant : « plus il y a d'*Enterobacteriaceae*, plus la probabilité de présence d'*E. sakazakii* est élevée ». Les informations collectées auprès des entreprises auditionnées⁽³⁷⁾ et les résultats présentés lors d'un colloque (Gazdov, Schoder *et al.* 2006) indiquent que la relation est différente d'une usine à l'autre. En effet, chaque usine a une **écologie microbienne différente**, liée notamment aux opérations d'hygiène qui y sont conduites. Si le ratio *E. sakazakii*/*Enterobacteriaceae* est petit, ce que prescrit le règlement semble logique. En revanche, si le ratio *E. sakazakii*/*Enterobacteriaceae* est grand, il est plus prudent de ne pas attendre les résultats de l'analyse des *Enterobacteriaceae* pour entreprendre celle d'*E. sakazakii*. C'est d'ailleurs ainsi que procèdent la plupart des entreprises auditionnées.

(38) Pour pouvoir utiliser l'estimation d'un nombre le plus probable d'une bactérie dans la poudre produite dans plusieurs usines, il est nécessaire de faire l'hypothèse que tous les lots sont similaires. Cette hypothèse est évidemment critiquable. Elle permet néanmoins d'estimer un ordre de grandeur de la contamination moyenne.

(39) <http://www.izworkout.com/mcuriale/mpn/index.html> (consulté le 2007-03-04)

(40) Depuis la rédaction de ces lignes, le règlement (CE) n° 1441/2007 du 5 décembre 2007 a amendé le règlement (CE) n° 2073/2005 du 15 novembre 2005 dans ce sens.

D-3.1. *Salmonella*

*Regarding the pertinence of the food safety criterion for Salmonella, a batch that does not meet the microbiological criterion of Regulation (EC) No 2073/2005 may contain ≥ 1.36 Salmonella/kg (confidence interval 95%: 1.9 per 10 kg to 9.6 per kg) (most probable number⁽³⁸⁾ calculated with MPN Calculator (Build 23)⁽³⁹⁾ for the sampling plan "absence in thirty 25g samples". This value is probably over ten times higher than the one characterising production in the aforementioned factories, since this hazard has remained undetected for years. This means that looking for this microbial hazard in the environment and product can seem futile. However, it is still useful to maintain a level of monitoring as Salmonella detection would probably be the sign of accidental contamination, which is what happened in France in 2005, and that can have health consequences on all categories of consumer. It is also known that ceasing such a monitoring or verification measure can prove harmful. The recent health crises argue for the **maintenance of a food safety microbiological criterion** for Salmonella.*

D-3.2. *E. sakazakii*

*In the version of 15 November 2005, Regulation (EC) No 2073/2005 lays down a food safety microbiological criterion for E. sakazakii only when the process hygiene criterion for Enterobacteriaceae has not been met⁽⁴⁰⁾. The implicit reasoning of the legislator is therefore that there is a constant ratio: "the more Enterobacteriaceae there are, the higher the probability of E. sakazakii being present". The information collected from the companies heard and the results presented at a conference (Gazdov, Schoder *et al.* 2006) indicate that the relationship is different from one factory to the next. Indeed, each factory has a different microbial ecology, associated particularly with the hygiene operations conducted in-situ. If the E. sakazakii / Enterobacteriaceae ratio is small, what the rule prescribes seems logical. However, if the E. sakazakii / Enterobacteriaceae ratio is big, it is safer not to wait for the results of the Enterobacteriaceae analysis before starting the E. sakazakii one. Incidentally, this is what most of the companies heard do.*

(38) To be able to use the estimation of a most probable number of a bacterium in the powder produced in several factories, it is necessary to assume that all the batches are similar. This hypothesis is evidently controversial. It does, however, enable an order of magnitude of average contamination to be estimated.

(39) <http://www.izworkout.com/mcuriale/mpn/index.html> (consulted on 2007-03-04).

(40) Since the writing of this report, Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 has amended Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 in this regard.

Le plan d'échantillonnage du règlement (CE) n° 2073/2005 pour *E. sakazakii*, « absence dans 30 prises d'essai de 10 g », signifie que la Commission européenne souhaite implicitement le rejet des lots où la concentration est supérieure à 3,39 *E. sakazakii*/kg (intervalle de confiance 95 % : 4,8 par 10 kg à 24 par kg). **On constate que les entreprises citées plus haut se situent en dessous de la borne inférieure de l'intervalle de confiance.**

D-3.3. Choix du plan d'échantillonnage

Un outil de calcul, intégrant le plus grand nombre de plans d'échantillonnage possibles devrait être élaboré pour aider les exploitants désireux d'optimiser leur décision. Les paramètres à prendre en compte seraient la masse du lot, le nombre moyen de nids de contamination sur l'ensemble du lot, la proportion relative de la zone contaminée, le nombre et la masse des prélèvements élémentaires, le niveau de regroupement des prélèvements, la proportion relative de poudre prélevée réellement analysée.

L'hypothèse d'agrégativité, qui correspond à une répartition non aléatoire de la contamination dans le lot constitue la situation la plus défavorable du point de vue de l'échantillonnage. La situation réelle n'a pas fait l'objet de publications scientifiques, et les industriels n'ont pas pu fournir d'information. De même on ignore l'influence de l'origine des contaminations (matières premières ou environnement) sur l'agrégativité si elle existe.

Actuellement les analyses des lots, telles qu'elles sont pratiquées, conduisent à déclarer non conformes certains lots. Ceci sous-entend que les autres lots sont conformes, ou que l'échantillon n'a pas permis de détecter qu'ils ne sont pas conformes. En dehors des anomalies (accidents ou incidents, p. ex. modification du procédé, remplacement d'une pièce d'équipement, intervention d'une équipe extérieure, changement de matières premières, opération d'hygiène incomplète ou mal conduite, emploi de personnel intérimaire ou de stagiaires, etc.), l'hygiène d'une ligne de fabrication peut être considérée comme **stationnaire**: sans être identique à tout instant, elle oscille autour d'un état stable. Pourquoi, dans ces conditions, les lots ne sont-ils pas tous conformes ou tous non conformes ? Est-ce à cause de l'amplitude de l'oscillation ?

*The sampling plan of Regulation (EC) No 2073/2005 for *E. sakazakii*, "absence in thirty 10g samples", shows that the European Commission implicitly desires the rejection of batches where the concentration exceeds 3.39 *E. sakazakii*/kg (confidence interval 95%: 4.8 per 10kg to 24 per kg). **It is noted that the aforementioned companies are below the lower bound of the confidence interval.***

D-3.3. Choosing the sampling plan

A calculation tool, integrating the largest possible number of sampling plans, should be created to help operators who would like to optimise their decision-making. The parameters to take into account would be the batch weight, the average number of contamination nests in the whole batch, the relative proportion of the contaminated zone, the number and weight of basic samples, the level of sample compositing and the relative proportion of sampled powder actually analysed.

The aggregativity hypothesis, assuming a non-random contamination distribution in the batch, gives the most unfavourable situation in sampling terms. The reality has not been covered by scientific publications, and manufacturers were unable to provide information. We are also unaware of the influence of the origin of contaminations (raw materials or environment) on aggregativity, if it exists.

*The way that batch analyses are currently conducted leads to some batches being declared as non-conforming. This implies either that the other batches are conforming, or that the fact that they are non-conforming could not be detected from the sample. Excluding anomalies (accidents or incidents, e.g. process modification, replacement of an equipment part, intervention by an external team, change in raw materials, incomplete or incorrectly conducted hygiene operation, employment of temporary staff or trainees, etc.), the hygiene of a production line can be considered **stationary**: without being exactly the same at all times, it stays more or less stable. Under such conditions, why are the batches not all conforming or non conforming? Is it because of the scale of fluctuation?*

L'une des entreprises auditionnées a voulu vérifier l'état stationnaire de la production et apporter une réponse à ces questions: en augmentant le nombre d'analyses et la prise d'essai, tous les lots se sont révélés contaminés au même niveau, qu'ils soient déclarés conformes ou pas par le contrôle réglementaire. En conclusion:

- l'hypothèse de la stabilité des conditions d'hygiène est vraisemblablement valide pour les lignes de fabrication d'usines présentant un niveau élevé de maîtrise sanitaire;
- la déclaration de non-conformité sur la base d'un échantillon de 30 prises d'essai dont une seule est positive peut conduire à écarter injustement des lots qui ne sont pas plus mauvais que les autres (risque du fournisseur);
- la réalisation d'un échantillon de 30 prises d'essai de 10 g ne permet pas de détecter à coup sûr (avec une probabilité de 100 %) un lot contaminé à faible niveau (quelques bactéries indésirables par kg) (risque de l'acheteur).

Le contrôle microbiologique n'est donc pas le seul outil pour garantir l'acceptabilité du lot. C'est la qualité de la production d'une ligne de fabrication donnée qu'il est utile d'estimer en **regroupant les données de surveillance de lots successifs** et en faisant des **analyses de tendance**, comme cela est proposé par le règlement (CE) n° 2073/2005: « *Les exploitants du secteur alimentaire peuvent utiliser d'autres procédures d'échantillonnage et d'essai lorsqu'ils sont en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que ces procédures fournissent des garanties au moins équivalentes. Ces procédures peuvent prévoir le recours à d'autres sites d'échantillonnage et à des analyses de tendances* » (article 5.5). Ceci est renforcé par l'exigence de l'article 9 de ce même règlement: « *Les exploitants du secteur alimentaire analysent l'évolution des résultats des essais. Lorsqu'une évolution approchant des résultats insatisfaisants est observée, ils prennent sans retard injustifié des mesures appropriées pour corriger la situation en vue de prévenir l'apparition de risques microbiologique* ».

Ces réflexions sur la surveillance des aliments où la survenue du danger étudié est rare s'appliquent **quels que soient les dangers**, sous réserve que l'hygiène de ligne de fabrication, soit considérée comme stationnaire.

One of the companies heard wanted to check the stationary state of production and provided a response to these questions: by increasing the number of analyses and sampling, all of the batches proved to be contaminated at the same level, whether declared conforming or not by the regulatory inspection. To conclude:

- *the assumed stability of hygiene conditions is probably valid for production lines in factories that have a high level of food safety control;*
- *the declaration of non-conformity on the basis of 30 sample, of which only one is positive, can lead to an unjustified rejection of batches that are not any worse than the others (supplier risk);*
- *taking a sample of thirty 10g samples does not enable the detection with certainty (with a 100% probability) of a slightly contaminated batch (some undesirable bacteria per kg) (purchaser risk).*

*Consequently, microbiological inspection is not the only tool to guarantee the admissibility of the batch. It is the quality of production of a given production line that it is useful to estimate by **grouping the monitoring data of successive batches** and by conducting **trend analyses**, as recommended by Regulation (EC) No 2073/2005: "Food business operators may use other sampling and testing procedures, if they can demonstrate to the satisfaction of the competent authority that these procedures provide at least equivalent guarantees. These procedures may include use of alternative sampling sites and use of trend analyses" (Article 5.5). This is reinforced by the requirement of Article 9 in the same Regulation: "Food business operators shall analyse trends in the test results. When they observe a trend towards unsatisfactory results, they shall take appropriate actions without undue delay to remedy the situation in order to prevent the occurrence of microbiological risks".*

*These considerations, on food monitoring where the occurrence of the hazard studied is rare, apply **whatever the hazards**, provided that the hygiene of the production line is considered to be stationary.*

D-3.4. Objectifs de performance

Pour *Salmonella* comme pour *E. sakazakii*, la Commission européenne, rend actuellement obligatoire des critères microbiologiques. À partir de ces derniers, on peut calculer la concentration bactérienne maximale qui permet de les respecter. Cette concentration constitue l'objectif sanitaire implicitement visé par la Commission européenne. L'autorité compétente pourrait aisément adopter une approche différente, en conformité avec les recommandations du *Codex alimentarius* (2006): fixer de façon explicite aux fabricants de préparations déshydratées en poudres des **objectifs de performance**⁽⁴¹⁾ adaptés aux catégories de consommateurs pertinentes (p. ex. les nourrissons à risque élevé, les personnes âgées, les nourrissons sans risque particulier) et tenant compte des modalités de reconstitution des biberons et de leur lieu d'utilisation. Un chapitre de l'ouvrage de l'ICMSF (2002) illustre comment établir des objectifs pour *Salmonella* dans les poudres de lait⁽⁴²⁾.

À titre d'exemple, imaginons que l'objectif de performance pour une catégorie d'aliment soit fixé à « moins d'une *E. sakazakii* par 10 kg de préparation ». L'exploitant pourra choisir le système approprié de surveillance par échantillonnage.

La plupart des personnes auditionnées ont exprimé le souhait que des objectifs de performance leur soient fournis par l'autorité compétente. C'est également une recommandation que l'Autorité européenne de sécurité des aliments a faite dès 2004 (Anonyme 2004). **L'Afssa encourage vivement cette approche. Elle entraînera une évolution des modalités du contrôle officiel, qui s'orientera vers la vérification de la réalisation des objectifs de performance.**

(41) Objectif de performance: « la fréquence maximale et/ou la concentration maximale d'un danger dans un aliment à une étape donnée de la chaîne alimentaire précédant la consommation et qui assure ou contribue à assurer la réalisation d'un objectif de sécurité alimentaire ou du niveau approprié de protection de la santé, selon le cas ». Adapté du Manuel de procédure du *Codex alimentarius*, 15^e édition, ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_15f.pdf (consulté le 2007-03-05).

(42) ICMSF (2002) *Salmonella* in dried milk. In *Micro-organisms in foods - 7 - Microbiological testing in food safety management* eds. Tomkin, R.B., Roberts, T.A., van Schothorst, M., Gram, L., Buchanan, R.L. and Dahms, S. New York (New York): Kluwer Academic/Plenum Publishers.

D-3.4. Performance objectives

For both *Salmonella* and *E. sakazakii*, the European Commission currently makes microbiological criteria compulsory, from which the maximum bacterial concentration can be calculated, ensuring that they are met. This concentration constitutes the sanitary objective that is implicitly targeted by the European Commission. The competent authority could easily adopt a different approach, in line with the recommendations of the *Codex Alimentarius* (2006): set explicit **performance objectives**⁽⁴¹⁾ for manufacturers of dried powdered formulae that are adapted to pertinent categories of consumers (e.g. high risk infants, elderly people, infants at no particular risk) and take account of how baby bottles are reconstituted and where they are used. A chapter in the ICMSF work (2002) illustrates how to set objectives for *Salmonella* in powdered milk⁽⁴²⁾.

For example, let's imagine that the performance objective for a food category is set at "less than one *E. sakazakii* per 10kg of product". The operator may choose the appropriate monitoring system by sampling.

Most of the people heard said that they would like performance objectives to be supplied by the competent authority. This is also what the European Food Safety Authority recommended in 2004 (Anonyme 2004). **Afssa strongly encourages this approach, which would bring about a change in official control methods, focusing more on the verification that performance objectives are met.**

(41) Performance Objective: "The maximum frequency and/or concentration of a hazard in a food at a specified step in the food chain before the time of consumption that provides or contributes to a food safety objective or appropriate level of protection, as applicable". Adapted from the *Codex Alimentarius Procedure Manual*, 15th edition, ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_15f.pdf (consulted on 2007-03-05).

(42) ICMSF (2002) *Salmonella* in dried milk. In *Micro-organisms in foods - 7 - Microbiological testing in food safety management* eds. Tomkin, R.B., Roberts, T.A., van Schothorst, M., Gram, L., Buchanan, R.L. and Dahms, S. New York (New York): Kluwer Academic/Plenum Publishers.

E-1. Quelle est l'efficacité des méthodes d'échantillonnage et d'analyse mises en œuvre, dans le cadre de la recherche des *Enterobacteriaceae* et plus précisément de *Salmonella* et *E. sakazakii* dans les préparations en poudre ?

E-1.1. Échantillonnage

Les méthodes d'échantillonnage des lots préconisées par la réglementation ont une efficacité limitée et ne peuvent à elles seules garantir l'innocuité des produits. Il est préférable d'opérer par échantillonnage systématique et d'utiliser le suivi des résultats obtenus sur une longue période, afin d'estimer les propriétés microbiologiques de la production des lignes de fabrication. Cette question est traitée en détail dans la section C et synthétisée dans la section D-3.

E-1.2. Méthodes d'analyse

Les méthodes disponibles sont décrites de façon approfondie dans le rapport. Les méthodes certifiées AFNOR VALIDATION donnent des résultats comparables à ceux des méthodes de référence. Cette question est traitée en détail dans la section B et synthétisée dans la section D-2.

E-2. Quelle est la pertinence de réaliser des prélèvements d'échantillons environnementaux en complément des prélèvements réalisés sur produits finis, si la contamination est faible ou aléatoire ?

L'efficacité des mesures d'hygiène doit être surveillée par des prélèvements environnementaux. Ceci est vrai dans la zone humide des lignes de fabrication, en raison de la possibilité de transfert des contaminations vers la zone sèche. C'est vrai aussi pour cette dernière, qui est une zone à risque élevé. En effet, la poudre y est conditionnée à l'air libre et, dans certaines usines, est additionnée d'ingrédients non séchés. Cette question est traitée en détail dans la section A et synthétisée dans la section D-1.

E-1. How effective are the sampling and analytical methods implemented to look for Enterobacteriaceae and more specifically *Salmonella* and *E. sakazakii* in powdered formulae?

E-1.1. Sampling

The batch sampling methods recommended by the regulations have a limited effectiveness and cannot guarantee product safety by themselves. It would be preferable to carry out systematic sampling and use the follow-up of results obtained over a long period to estimate the microbiological properties of production lines. This question is addressed in detail in section C and summarised in section D-3.

E-1.2. Analytical methods

The methods available are described in detail in the report. The AFNOR VALIDATION-certified methods give similar results to those obtained through the reference methods. This question is addressed in detail in section B and summarised in section D-2.

E-2. How relevant is it to take environmental samples in addition to samples from the finished products, if contamination is low or random?

The effectiveness of hygiene measures must be monitored by taking environmental samples. This is true in the wet zone of production lines due to the possibility of contaminations being transferred to the dry zone. It is also true for the dry zone, which is at high risk because the powder is exposed to the air of the factory when packaged and, in some factories, undried ingredients are added. This question is addressed in detail in section A and summarised in section D-1.

E-3. Éléments scientifiques sur l'origine de la contamination du poste de lécithination

La lécithine sous forme d'un liquide aqueux est ajoutée à la poudre dans des conditions qui ne sont pas aseptiques. La présence d'humidité est un facteur de risque, car elle permet la prolifération des contaminants microbiologiques. Il est important que les caractéristiques microbiologiques des ingrédients soient en cohérence avec ceux exigés des préparations en poudre. Cette question est traitée en détail dans la section A et synthétisée dans la section D-1.

E-4. Quelle est la pertinence des résultats d'analyse obtenus par méthode alternative de type PCR ?

Les méthodes utilisant la PCR classique ne font pas la distinction entre les bactéries mortes et les bactéries vivantes, et en outre elles peuvent donner des résultats faussement positifs du fait de contaminations involontaires au laboratoire. Il est donc utile de confronter leurs résultats à d'autres informations. Le diagramme de la Figure 3 peut être utilisé pour interpréter les résultats d'analyse obtenus par PCR, dans un contexte épidémique, au moyen des autres résultats qu'il est souhaitable de rassembler. Cette question est traitée en détail dans la section B-4 et synthétisée dans la section D-2.

E-3. Scientific facts on how the lecithination station became contaminated

Lecithin in aqueous liquid form is added to the powder in conditions that are not aseptic. The presence of humidity is a risk factor as it fosters proliferation of microbiological contaminants. It is important that the microbiological characteristics of the ingredients are the same as those required for the powdered formulae. This question is addressed in detail in section A and summarised in section D-1.

E-4. How relevant are the analysis results obtained by PCR-type alternative method?

The methods using conventional PCR do not distinguish between dead and living bacteria, and can give falsely positive results because of accidental contamination in the laboratory. It would therefore be useful to compare their results with other information. The diagram in Figure 3 can be used to interpret the analysis results obtained by PCR, in an epidemic context, using other results that would be worth gathering. This question is addressed in detail in section B-4 and summarised in section D-2.

À l'attention de l'autorité compétente

1. Faire reposer la gestion du risque sur des objectifs de performance, tels que définis par le *Codex alimentarius*, établis selon les catégories de consommateurs en fonction des modalités de reconstitution.
2. Faire évoluer les procédures d'inspection officielle pour que, lors de la prise de décision relative à un lot isolé se révélant non conforme au critère microbiologique réglementaire, il soit tenu compte de l'ensemble des données rassemblées par les exploitants, c'est-à-dire des études de suivi de la qualité microbiologique des produits finis et des résultats des analyses microbiologiques de l'environnement d'atelier.
3. Appuyer une modification du règlement européen de façon à ne pas faire dépendre le critère microbiologique de sécurité relatif à *E. sakazakii* du critère microbiologique d'hygiène de procédé *Enterobacteriaceae*, ou, mieux, laisser aux exploitants la responsabilité des moyens de surveillance leur permettant d'assurer les objectifs de performance fixés pour leurs produits⁽⁴³⁾. Le rôle des guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'applications des principes HACCP dans ce contexte mérite d'être rappelé.
4. Publier la liste des méthodes microbiologiques utilisables pour l'analyse des produits mis sur le marché français à côté des méthodes normalisées et des méthodes certifiées conformément au protocole défini dans la norme NF EN ISO 16140.

À l'attention des laboratoires de recherche

5. Poursuivre le développement de méthodes pour améliorer les seuils de détection et pour permettre la détection et la distinction des bactéries viables, viables mais non cultivables, ou mortes.
6. Étudier les effets du regroupement des prises d'essai sur la détection des *Enterobacteriaceae* et d'*E. sakazakii*. Confirmer les effets du regroupement des prises d'essai sur la détection de *Salmonella*.

(43) Depuis la rédaction de ces lignes, le règlement (CE) n° 1441/2007 du 5 décembre 2007 a amendé le règlement (CE) n° 2073/2005 du 15 novembre 2005 dans ce sens.

For the attention of the competent authority

1. Base risk management on performance objectives as defined by the *Codex Alimentarius*, adapted to consumer categories depending on how the powders are reconstituted.
2. Develop the official inspection procedures so that, when making a decision about an isolated batch identified as non-conforming to the regulatory microbiological criterion, all of the data gathered by operators are taken into account, i.e. follow-up studies of the microbiological quality of finished products and results of microbiological analyses of the factory environment.
3. Propose a modification of the European Regulation so that the safety microbiological criterion for *E. sakazakii* does not depend on the *Enterobacteriaceae* process hygiene microbiological criterion, or better still, make operators responsible for monitoring means through which they can meet the performance objectives set for their products⁽⁴³⁾. The role of guides to good practice for hygiene and for the application of the HACCP principles in this context would be worth mentioning again.
4. Publish the list of usable microbiological methods for analysing products placed on the French market in addition to standardised methods and certified methods in accordance with the protocol defined in standard NF EN ISO 16140.

For the attention of research laboratories

5. Continue developing methods to improve detection limits and to enable the detection and distinction of viable, viable but non culturable and dead bacteria.
6. Study the effects of compositing samples on the detection of *Enterobacteriaceae* and *E. sakazakii*. Confirm the effects of compositing samples on the detection of *Salmonella*.

(43) Since the writing of this report, Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 has amended Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 in this regard.

À l'attention des organismes de normalisation et de validation.

- 7.** Harmoniser au niveau international les normes décrivant les protocoles de validation des méthodes d'analyse.
- 8.** Dans la mesure du possible, fixer des seuils pour les critères de performance.
- 9.** Normaliser l'étude des effets du regroupement des prises d'essai sur les performances des méthodes d'analyse.
- 10.** Tenir compte dans les normes, s'il y a lieu, des cas où le regroupement des prélèvements élémentaires n'a pas d'effet.
- 11.** Publier les arguments sur lesquels les commissions de validation fondent leurs décisions.

À l'attention des exploitants

- 12.** Attacher la plus grande importance aux prélèvements environnementaux en complément des prélèvements de produits en cours ou en fin de production car l'analyse microbiologique des lots par échantillonnage ne peut permettre de garantir à elle seule l'innocuité des produits mis sur le marché. Ceci concerne non seulement les *Enterobacteriaceae* comme cela est imposé par le règlement (CE) n° 2073/2005, mais aussi *Salmonella* et *E. sakazakii*.
- 13.** Organiser le suivi des résultats des analyses de façon à caractériser sur une longue période le statut hygiénique des lignes de fabrication, en utilisant des méthodes statistiques appropriées.
- 14.** Publier un guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP, prenant en compte notamment les dangers considérés dans ce rapport.

For the attention of standardisation and validation organisations


- 7.** *Harmonise at the international level the standards describing protocols for validating analytical methods.*
- 8.** *Set limits for the performance criteria as far as possible.*
- 9.** *Standardise the study of the effects of compositing samples on the performances of analytical methods.*
- 10.** *Take account in the standards of cases where compositing basic samples has no effect, if necessary.*
- 11.** *Publish the arguments on which the validation commissions base their decisions.*

For the attention of operators

- 12.** *Give priority to environmental samples together with samples of products in progress or finished, as the microbiological analysis of batches by sampling alone cannot guarantee the safety of products placed on the market. This concerns not only Enterobacteriaceae as stipulated by Regulation (EC) No 2073/2005, but also Salmonella and E. sakazakii.*
- 13.** *Organise the follow-up of analysis results so as to characterise the hygiene status of production lines over a long period of time, by using appropriate statistical methods.*
- 14.** *Publish a guide to good practice for hygiene and for the application of HACCP principles by taking particular account of the hazards considered in this report.*

Annexe I. Saisine de la DGAL, DGS et DGCCRF du 4 novembre 2005

2005-SA-0313
 4 NOV. 2005



Liberté - Égalité - Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

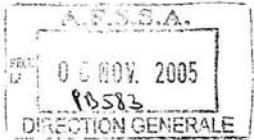
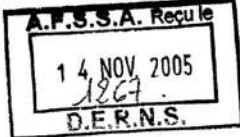
AST → DERNS

Ministère de la santé et des solidarités
Ministère de l'agriculture et de la pêche
Ministère de l'économie et des finances

**Direction générale de la
santé**

**Direction générale de
l'alimentation**

**Direction générale le concurrence, de
la consommation et de la répression
des fraudes**

Madame la Directrice générale
de l'Agence française de sécurité sanitaire des
aliments

27-31 avenue du Général Leclerc
BP 19
94701 Maison-Alfort cedex

Objet : Avis scientifique et technique sur la contamination microbiologique des poudres de lait .

P.J. : Historiques des alertes concernant les laits en poudre de marque Prégestimil ; Picot Blédilait ; Matines.

Copie : Madame M. Eliazewicz - DERNS

Parmi les alertes d'origine alimentaire des huit derniers mois gérées en interministériel, trois ont concerné des laits en poudre, soit pour nourrissons et enfants en bas âge, soit pour adultes, et ont été à l'origine de toxi-infections. Un historique des principaux événements est joint en annexe (alerte Prégestimil de Mead Johnson avec une contamination par *Enterobacter sakazakii* ; alerte Picot de Célia puis Blédilait de Blédina avec une contamination par *Salmonella Agona* et alerte Matines de SILL avec une contamination par *Salmonella Worthington*).

Toutes ces alertes ont en commun des autocontrôles libératoires négatifs.

Compte tenu de la multiplication récente des alertes impliquant les laits en poudre et afin d'assurer la protection des consommateurs, notamment les plus fragiles, les administrations en charge de la gestion du risque souhaiteraient disposer d'éléments permettant d'évaluer les moyens de maîtrise mis en place par les professionnels de ce secteur.

Afin de favoriser la mise en place de mesures de surveillance efficaces et prévenir ainsi ces contaminations nous vous saurions gré :


➤ D'apprécier l'efficacité de la méthode d'échantillonnage et d'analyse notamment dans le cadre de la recherche d'entérobactéries sur les poudres de lait (choix de la méthode : méthodes ISO retenues comme référence pour les opérateurs dans le projet de règlement relatif aux critères microbiologiques ; FIL ; AOAC...)

➤ D'évaluer la pertinence des résultats d'analyses obtenus par des méthodes alternatives sensibles et spécifiques comme la PCR pour la détection de ces bactéries (matrice inhibitrice, détection de bactéries mortes ou stressées ...).

➤ D'améliorer l'analyse du danger « Salmonella » et d'autres enterobactéries, par le professionnel en évaluant, la pertinence des prélèvements d'échantillons environnementaux versus les prélèvements d'échantillons de poudre de lait dès lors que la contamination est faible ou aléatoire.

Par ailleurs, lors des deux dernières alertes, le poste de lécithination semblait être à l'origine de la contamination et nous souhaiterions disposer d'éléments scientifiques permettant d'expliquer cette possible origine commune.

**Le Directeur Général de la Concurrence,
de la Consommation,
et de la Répression des Fraudes**



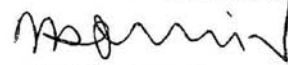
Guillaume CERUTTI

La Directrice Générale de l'Alimentation



Sophie VILLERS

Le Directeur Général de la Santé,



Pr Didier HOUSSIN

Annexe II. Décision de création du groupe de travail du 17 mars 2006

AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

Décision n° 2006-05-311
Relative au groupe de travail
« Contamination microbienne des préparations lactées en poudre pour
nourrissons ou personnes âgées »

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1323-4 et R.1323-22 ;

Vu l'arrêté du 23 août 2000 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu la décision du 17 juillet 2003 établissant une liste d'experts auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 15 octobre 2003 modifiant l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 18 août 2004 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu le règlement intérieur de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

DECIDÉ :

Article premier. Il est créé, sur proposition du comité d'experts spécialisé « Microbiologie » lors de la réunion du 29 novembre 2005, un groupe de travail dénommé « Contamination microbienne des préparations lactées en poudre pour nourrissons ou personnes âgées », chargé d'évaluer, dans le cadre de la recherche de contaminant microbien dans les poudres de lait :

- l'efficacité des méthodes d'échantillonnage et d'analyse mises en œuvre,
- la pertinence des résultats obtenus par des méthodes alternatives sensibles et spécifiques de type PCR,
- la pertinence des prélèvements environnementaux dans le cadre d'une contamination faible et aléatoire, afin d'améliorer l'analyse du danger par le professionnel.

Article 2. Le groupe de travail mentionné à l'article premier est composé des membres suivants :

- Membres du comité d'experts spécialisé « Microbiologie » :
 - M. **Catteau Michel**
 - M. **Cerf Olivier**
 - M. **Colin Pierre**
 - M. **Denis Jean-Baptiste**
 - M. **Fédérighi Michel**
 - Mme **Livrelli Valerie**
 - M. **Rosec Jean-Philippe**
 - Mme **Vaillant Véronique**

- Autres experts :

Mme **Brisabois Anne** ✓ (Afssa Lerqap)
Mme **Lafarge Véronique** ✓ (Afssa Lerqap)
M. **Lombard Bertrand** ✓ (Afssa Lerqap)
M. **Leclercq Alexandre** ✓ (Institut Pasteur, Paris)
M. **Vincent Jean-Pierre** ✓ (SERMHA, Institut Pasteur, Lille)

Article 3. M. Cerf Olivier est nommé président du groupe de travail mentionné à l'article premier. M. Leclercq Alexandre est nommé vice-président du groupe de travail mentionné à l'article premier.

Article 4. Les conclusions du groupe de travail seront présentées au comité d'experts spécialisé « Microbiologie » dans un délai de 12 mois.

Article 5. La coordination scientifique du groupe de travail mentionné à l'article premier est assuré par Mme Bultel Coralie et M. Lailler Renaud (UERB) et un appui scientifique et technique sera apporté par Mme Bemrañ-Aouachria Nawel (PASER) de la Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires.

Fait à Maisons-Alfort, le **17 MARS 2006**

La Directrice générale de l'Agence française de
sécurité sanitaire des aliments



Pascale BRIAND

Annexe III. Décision du 28 février 2007 apportant modification à la décision de création du groupe de travail du 17 mars 2006.

AGENCE FRANÇAISE DE SECURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

**Décision n° 2006-05-311
Relative au groupe de travail
« Contamination microbienne des préparations lactées en poudre pour
nourrissons ou personnes âgées »**

La Directrice générale de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1323-4 et R.1323-22 ;

Vu l'arrêté du 4 août 2006 portant nomination des membres des comités d'experts spécialisés de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 17 octobre 2006 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 27 décembre 2006 modifiant l'arrêté du 17 octobre 2006 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu la décision du 27 octobre 2006 portant nomination à des comités d'experts spécialisés de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu le règlement intérieur de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

DECIDE :

Article 4. Le mandat du groupe de travail « Contamination microbienne des préparations lactées en poudre pour nourrissons ou personnes âgées », institué par la décision n° 2006-05-311 du 17 mars 2006, est prolongé jusqu'au 31 septembre 2007.

Fait à Maisons-Alfort, le **28 FEV. 2007**

La Directrice générale de l'Agence française de
sécurité sanitaire des aliments



Pascale BRIAND

Annexe IV. Questionnaire préparatoire, adressé aux représentants des groupes industriels auditionnés dans le cadre du groupe de travail

Questionnaire destiné aux industriels, producteurs de préparation en poudre destinées aux nourrissons ou aux personnes âgées.

Afin de dégager des recommandations pratiques destinées à améliorer la maîtrise des dangers que sont les *Enterobacteriaceae* et plus particulièrement *Enterobacter sakazakii* et *Salmonella*, un groupe de travail a été mis en place par l'Afssa, en réponse à une saisine des administrations. Ce groupe est chargé d'identifier les voies potentielles de contamination, au cours des différentes étapes du procédé de fabrication des préparations en poudre pour nourrissons et personnes âgées (Partie A) et de conduire une réflexion sur les méthodes d'analyse et sur les plans d'échantillonnage utilisés ou proposés au regard des différentes réglementations, destinés au contrôle de ces produits (Partie B).

À ce stade de nos réflexions, nous vous sollicitons afin de recueillir des informations et si possible des données de terrain, à partir de votre expérience et de vos pratiques. Nous vous serions reconnaissants de répondre au questionnaire ci-dessous, en reportant les numérotations des différents items. Si nos formulations ne vous conviennent pas, apportez quand même les réponses qui vous semblent les plus appropriées. Nous vous remercions par avance pour votre contribution. Vos réponses seront traitées de manière confidentielle.

Partie A: Questions relatives aux modalités de contamination lors du procédé de fabrication

1. Quels sont les **principaux produits fabriqués** ?

2. **Diagrammes de fabrication** de ces poudres. Indiquer :

- les matières premières utilisées (origine, critères de sélection, contrôle) ;
- les ingrédients incorporés (origine, critères de sélection, lieu et mode d'incorporation) ;
- les points sensibles identifiés, c'est-à-dire les points où des dangers microbiologiques peuvent entrer dans la chaîne de fabrication et contaminer le produit ou éventuellement s'y multiplier ;
- les étapes de maîtrise : lieu, mesures de maîtrise (p. ex. traitement thermique avec barème), maîtrise de la contamination de l'air et de l'eau, des matières premières, des autres ingrédients, des produits finis ou en cours de fabrication, etc.

3. **Poste de lécithination**

- Lieu, intérêt de ce poste, moyens de maîtrise des dangers.

4. **Hygiène des locaux**

- Plans de nettoyage et de désinfection (procédures, fréquence, contrôle).
- Campagnes d'éradication des insectes et rongeurs : contrat avec un sous-traitant ou solution interne ? – Préciser les plans d'actions.
- Zonage : bases de décision et conception.
- Existe-t-il un suivi (monitorage, cartographie, etc.) microbiologique ou particulière des différentes zones ? Si oui, en quoi consiste-t-il ?

5. **Hygiène du matériel**

- Plans de nettoyage et de désinfection (procédures, fréquence, contrôle)

6. **Hygiène du personnel (procédures, contrôle)**

- Quels sont les outils de management de l'hygiène que vous utilisez : prélèvements pour analyses microbiologiques, audits comportementaux, etc.
- Quel est le plan de formation (à l'hygiène) des personnels (présentiel et/ou apprentissage par Internet et/ou formations internes ? périodicité ? évaluation des acquis ?)
- Lorsque vous avez recours à du personnel intérimaire, y a-t-il formation à l'embauche ?

7. Plan de contrôle microbiologique

- Réalisez-vous un échantillonnage sur les ingrédients ? Si oui, pouvez-vous le décrire ?
- Réalisez-vous un échantillonnage en cours de fabrication ? Si oui, pouvez-vous le décrire ?
- Réalisez-vous un échantillonnage dans l'environnement de la chaîne de fabrication ? Si oui, pouvez-vous le décrire ?
- Micro-organismes recherchés et/ou dénombrés ?
- Critères internes, corrections et actions correctives envisagées en cas de dépassement de ces critères ?

Partie B: Questions relatives aux méthodes d'analyse et d'échantillonnage des produits finis

Nous souhaiterions que vous répondiez aux questions 7 à 12, de manière indépendante pour les 3 types de flore qu'il nous a paru judicieux de distinguer :

(a) *Enterobacteriaceae*

(b) *Enterobacter sakazakii*

(c) *Salmonella*

Indiquez « *idem* » pour ne pas recopier, indiquez « *inconnu* » si vous ne savez pas répondre, « *pas de réponse* » si vous ne souhaitez pas répondre.

8. Répartition des bactéries dans le produit au sein d'un lot

- Comment les bactéries sont-elles réparties dans le produit ?
 - répartition uniforme (homogène)
 - répartition agrégative (hétérogène)
 - répartition systématique (régulière et peu aléatoire)
- Y a-t-il des circonstances qui modifient le type de répartition ?

9. Apparition des bactéries dans le temps (d'un lot à l'autre)

- Y a-t-il des périodes pour lesquelles la fréquence de détection est plus élevée ou plus faible, sous réserve d'utilisation d'une même méthode ?
- Si oui, pouvez-vous relier ce phénomène à un événement ?
 - (1) changement de matière première,
 - (2) modification des opérations d'hygiène,
 - (3) maintenance des installations,
 - (4) variation météorologique,
 - (5) autre (préciser)
- Comment qualifieriez-vous ces variations ?
 - (1) graduelles (dérive)
 - (2) accidentelles (aléatoire)

10. Analyses microbiologiques

- Quelles techniques d'analyse microbiologique utilisez-vous ? Sont-elles validées AFNOR et/ou AOAC ?
- En particulier, quelle quantité est prélevée pour une analyse et quelle proportion de la production représente-t-elle ?

- Comment prenez-vous en compte les caractéristiques métrologiques de ces techniques (seuil de détection, sensibilité⁽⁴⁴⁾, spécificité⁽⁴⁵⁾) ?
- Auriez-vous des idées sur la façon dont ces procédures et techniques pourraient être améliorées ?

11. Unité formant colonie (UFC)

- Lorsqu'une unité formant colonie est détectée, à quoi correspond-elle ?
 - (1) à une seule cellule bactérienne
 - (2) à plusieurs (ordre de grandeur) cellules bactériennes
- En d'autres termes, ces bactéries se trouvent-elles sous forme de cellules isolées les unes des autres, ou sous forme d'amas (de quelle taille) ?

12. Protocoles d'échantillonnage

- Quels protocoles d'échantillonnage suivez-vous ?
 - (1) cartes de contrôle
 - (2) plan glissant
 - (3) autre (préciser)
- Quelle production est représentée par une prise d'échantillon [nombre de prélèvements par lot, taille du lot] ?
- Quelle est la fréquence de ces prises ?
- Combien de prélèvements comporte-t-elle ?
- Quelles seraient selon vous les marges de progrès possibles et les contraintes associées ?
- Quels sont les facteurs qui vous paraissent importants pour déterminer un lot, dans le cadre d'un plan d'échantillonnage ?
 - (1) période de production (et laquelle)
 - (2) unité de production (et quelle échelle)
 - (3) matières premières (et lesquelles)
 - (4) autre (préciser)

13. Ordres de grandeur

Dans la mesure où votre réponse ne sera utilisée que pour l'optimisation des plans d'échantillonnage, et ne sera en aucun cas reliée au nom de votre société, pouvez-vous nous fournir des chiffres caractéristiques de ce que vous trouvez au moyen des analyses que vous pratiquez ?

- (1) tonnages-durée de non-détection consécutive
- (2) niveaux de prévalence associés à des quantités de matière prélevée ou investiguée
- (3) concentrations

Commentaires

Ajoutez tous les autres éléments ou commentaires qui vous semblent pertinents sur le sujet. Par exemple, mentionnez d'autres micro-organismes à considérer.

Merci beaucoup pour votre collaboration.

Date :

Poste et coordonnées du correspondant :

(44) Proportion de prises d'essai détectées contaminées parmi les prises d'essai testées qui étaient réellement contaminées.

(45) Proportion de prises d'essai détectées négatives parmi les prises d'essai testées qui étaient réellement non contaminées.

Annexe V. Tableau de synthèse des différentes méthodes normalisées ou validées, utilisées pour la recherche et/ou dénombrement des *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* et *E. sakazakii*, à la date du 30 mars 2007

Annex V. Summary table of the different standardised or validated methods used to look for and/or count Enterobacteriaceae, Salmonella and E. sakazakii, as at 30 March 2007

Méthode / Method	Statut* / Status*	Objectif / Objective		Culture †			Type de test / Test type
		Recherche / Research	Dénombrement / Numeration	Pré-enrichissement (PE) / Enrichissement (E) / Pre-enrichment (PE) / Enrichment (E)	Isolément / Isolation	Identification des colonies / Colonies identification	
pour <i>Enterobacteriaceae</i> / for <i>Enterobacteriaceae</i>							
NF ISO 21528-1	N, Rf, H	x	x (NPP à 37 °C) si < 100 ufc/ml ou g (MPN at 37°C) if < 100 cfu/ml or g	PE + E	Oui / Yes	Oui / Yes	Culture
NF ISO 21528-2	N, Rf, H		x (comptage à 37 °C) si > 100 ufc/ml ou g (counting at 37°C) if > 100 cfu/ml or g	Non / No	Oui / Yes	Oui / Yes	
NF Vo8-054	N, Rt, H	x	x (comptage à 30 °C) (counting at 30°C)	Non / No	Oui / Yes	Non / No	
Test 3M™ Petrifilm™ <i>Enterobacteriaceae</i>	AV, H		x	Non / No	Oui / Yes	possible	
TEMPO EB BioMérieux	AV, H		x (NPP à 35°C) (MPN at 35°C)	Non / No	Non / No	Non / No	
pour <i>Enterobacter sakazakii</i> / for <i>Enterobacter sakazakii</i>							
ISO/TS 22964 FIL/RM 210	N, Rf, S			PE + E	Oui / Yes	Oui / Yes	Culture
Méthode FDA / FDA method	Rf, H	x	/	PE + E	Oui / Yes	Oui / Yes	

* Rf, méthode de référence; Rt, méthode de routine, N, méthode normalisée; H, méthode horizontale; S, méthode sectorielle, AV, méthode alternative validée.

† Toute méthode bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION nécessite la confirmation d'un signal positif du test.

* Rf, reference method; Rt, routine method; N, normalised method; H, horizontal method; AV, validated alternative method.

† Any AFNOR VALIDATION marked method requires a confirmation of positive test's result.

Méthode / Method	Statut* / Status*	Objectif / Objective		Culture †			Type de test / Test type
		Recherche / Research	Dénombrement / Numeration	Pré-enrichissement (PE) / Enrichissement (E) / Pre-enrichment (PE) / Enrichment (E)	Isolément / Isolation	Identification des colonies / Colonies identification	
pour Salmonella / for Salmonella							
NF EN ISO 6579	N, Rf, H	x	/	PE + E	Oui / Yes	Oui / Yes	Culture
PR NF EN ISO 6785 (FIL93)	N, Rf, S			PE + E	Oui / Yes	Oui / Yes	
Méthode officielle AOAC	Rf, S			PE + E	Oui / Yes	Oui / Yes	
Simple Method For Salmonella (SMS)	AV, H			PE	Non / No	Non / No	
Rapid Salmonella	AV, H			PE + E	Oui / Yes	Oui / Yes	
OXOID Salmonella Rapid Test	AV, H			PE	Non / No	Non / No	Immunologique / immunological
RAPIDYME Salmonella	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	
BIOLINE Salmonella Elisa Test SELECTA	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	Immuno-enzymatique / Immuno-enzymatic
BIOLINE Salmonella Elisa Test OPTIMA	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	
VIDAS Salmonella (protocole simple voie)	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	
VIDAS Salmonella (protocole double voie)	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	
VIDAS ICS-SLM	AV, H			PE	Non / No	Non / No	
VIDAS ICS-boîte	AV, H			PE	Oui / Yes	Oui / Yes	
VIDAS Easy Salmonella	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	
Plate Salmonella Gold	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	
Ultima Salmonella	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	
Unique Salmonella	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	
Lumiprobe 24 Salmonella	AV, H			PE + E	Non / No	Non / No	Hybridation moléculaire / Molecular hybridisation
BAX™ Salmonella	AV, H	PE ± E	Non / No	Non / No	PCR temps réel / Real time PCR		
GeneDiscCycler Salmonella	AV, H	PE	Non / No	Non / No			
IQ-check Salmonella	AV, H	PE ± E	Non / No	Non / No			

* Rf, méthode de référence; Rt, méthode de routine, N, méthode normalisée; H, méthode horizontale; S, méthode sectorielle, AV, méthode alternative validée.

† Toute méthode bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION nécessite la confirmation d'un signal positif du test.

* Rf, reference method; Rt, routine method; N, normalised method; H, horizontal method; AV, validated alternative method.

† Any AFNOR VALIDATION marked method requires a confirmation of positive test's result.

Références bibliographiques

- ADASC (1999). *Australian manual for control of Salmonella in the dairy industry*: Australian Dairy Authorities' Standards Committee.
- Afssa (2005). *Recommandations d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons - Hygiène recommandations for the preparation, handling and storage of feeding bottles*: 113p. <http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Ra-BIB.pdf> (ISBN : 2-11-095456-6).
- Anonyme (2004). "Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae (Question N° EFSA-Q-2003-111)." *The EFSA Journal* **113**: 1-34.
- Anonyme (2005). *R Development Core Team*. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Anonyme (2007). "Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission for review of the opinion on microbiological risks in infant formulae and follow on formulae with regard to *Enterobacteriaceae* as indicators (Question No EFSA-Q-2006-078)." *The EFSA Journal* **444**: 1-14.
- Besse, N. G., A. Leclercq, *et al.* (2006). "Evaluation of the International Organization for Standardization-International Dairy Federation (ISO-IDF) draft standard method for detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant food formulas." *J. AOAC Int* **89** (5): 1309-16.
- Brouard, C., E. Espié, *et al.* (2007). "Two consecutive large outbreaks of *Salmonella enterica* serotype Agona infections in infants linked to the consumption of powdered infant formula." *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26** (2): 148-152.
- Burgess, K. J. and the Group D44 (1994). "Recommendations for the hygienic manufacture of milk and milk based products." *Bull. Int. Dairy Fed.* **292**: 1-32.
- Chaouche, A. and Parent E. (1998). Sur l'apport des statistiques bayésiennes au contrôle statistique de la qualité par attribut. Partie 3 : Contrôle rétrospectif par détection de changement dans une série de variables binomiales. *Revue de Statistiques Appliquées*, **46**: 5-29.
- Codex alimentarius* (2006). *Draft Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Management, Annex IV*. Report of the Thirty-Eighth Session of the Codex Committee on Food Hygiene, Houston, United States of America, 4-9 December 2006. www.codexalimentarius.net
- Coignard, B. et V. Vaillant (2006). Infections à *Enterobacter sakazakii* associées à la consommation d'une préparation en poudre pour nourrissons. France, octobre à décembre 2004. Rapport d'investigation. Saint-Maurice, Institut de Veille Sanitaire: 85 p.
- Derzelle, S. et F. Dilasser (2006). "A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulae." *BMC Microbiol* **6**: 100.
- Derzelle, S., F. Dilasser *et al.* (2007). "Comparison of three chromogenic media and evaluation of two molecular-based identification systems for the detection of *Enterobacter sakazakii* from environmental samples from infant formulae factories." *J. Food Prot.* **70**: 1678-1684.
- FAO/OMS (2004). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report, Microbiological Risk Assessment Series, No. 6: 68, Rome (ISBN : 92-4-156262-5).
- FAO/OMS (2006). *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report, Microbiological Risk Assessment Series, No. 10: 95, Rome (ISBN : 92-5-105574-2).
- Federighi, M. (2004). "Les formes viables non cultivables des bactéries : point de vue et retour d'expérience d'un hygiéniste." *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **19** (4): 237-252.
- Gazdov, B., D. Schoder, *et al.* (2006). *Molecular characterization of Enterobacter sakazakii to elucidate contamination in a milk powder processing plant*. COST 920 Meeting "Future Challenges to Foodborne Zoonosis", Ploufragan (France).

- Guillaume-Gentil, O., V. Sonnard, *et al.* (2005). "A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples." *J Food Prot.* **68**: 64-9.
- Habraken, C. J. M., D. A. A. Mossel, *et al.* (1986). "Management of *Salmonella* risks in the production of powdered milk products." *Neth. Milk Dairy J.* **40**: 99-116.
- ICMSF (1974) Sampling plans for situations involving direct hazard from pathogens, in *Micro-organisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications*, eds T.A. Roberts, F.L. Bryan, J.H.B. Christian, D. Kilsby, J.C. Olson and J.H. Silliker. Blackwell Scientific Publications: Oxford (UK).
- ICMSF (2002) Sampling to assess control of the environment, in *Micro-organisms in foods. 7. Microbiological testing in food safety management*, eds R.B. Tomkin, T.A. Roberts, M. van Schothorst, L. Gram, R.L. Buchanan and S. Dahms. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York (New York).
- ISO 18593: 2004 Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons. www.iso.org
- Iversen, C., P. Druggan, *et al.* (2004). "A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study." *Int. J. Food Microbiol.* **96**: 133-9.
- Iversen, C., L. Lancashire, *et al.* (2006). "Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of Artificial Neural Networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data." *BMC Microbiol.* **6**: 28, doi: 10.1186/1471-2180-6-28.
- Iversen C., Lehner A., *et al.* (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 64 doi: 10.1186/1471-2148-7-64.
- Kandhai, M. C., M. W. Reij, *et al.* (2004). "A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples." *J. Food Prot.* **67** (6): 1267-70.
- Lafarge, V., J. C. Ogier, *et al.* (2004). "Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration." *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (9): 5644-50.
- Lehner, A., S. Nitzsche, *et al.* (2006). "Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection." *BMC Microbiol.* **6**: 15, doi: 10.1186/1471-2180-6-15.
- Lehner, A., K. Riedel, *et al.* (2006). "Molecular characterization of the alpha-glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism." *Syst. Appl. Microbiol.* **29** (8): 609-25.
- Lehner, A., T. Tasara, *et al.* (2004). "16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification." *BMC Microbiol.* **4**: 43, doi: 10.1186/1471-2180-4-43.
- Liu, Y., Q. Gao, *et al.* (2006). "PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula." *Mol. Cell. Probes* **20** (1): 11-7.
- Mager, K., J. G. H. Hutten, *et al.* (2006). "Hygienic Engineering of fluid bed and spray dryer plants." *Trends in Food Science and Technology* **17**: 621-625.
- Mahaut M., J. R., Brulé G. et Schuck P. (2000). Les produits industriels laitiers. Lavoisier Paris.
- Malorny, B. and M. Wagner (2005). "Detection of *Enterobacter sakazakii* strains by Real-Time PCR." *J. Food Prot.* **68**: 1623-1627.
- Mullane, N. R., J. Murray, *et al.* (2006). "Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic-magnetic-bead capture." *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6325-30.
- Nair, M. and K. S. Venkitanarayanan (2006). "Cloning and sequencing of the ompA gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula." *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2539-2546.

Perelle, S., F. Dilasser, *et al.* (2004). "Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples." Mol. Cell Probes **18**: 409-20.

Restaino, L., E. W. Frampton, *et al.* (2006). "A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources." J. Food Prot. **69**: 315-22.

Rudi, K., B. Moen, *et al.* (2005). "Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples." Appl. Environ. Microbiol. **71**: 1018-24.

Seo, K. H. and R. E. Brackett (2005). "Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay." J. Food Prot. **68**: 59-63.

Silliker J.H. and Gabis D.A. (1973). ICMSF methods studies. 1. Comparison of analytical schemes for detection of *Salmonella* in fried foods. Canadian Journal of Microbiology **19** : 475-479 [cité par ICMSF 1974].

Yang, C., Y. Jiang, *et al.* (2003). "Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water." FEMS Immunol. Med. Microbiol. **38**: 265-71.

Création et mise en page : Parimage
Impression : Bialec, Nancy (France)
ISBN : 978-2-11-097784-7
2 000 exemplaires
Dépôt légal : décembre 2008 - N° 70742

Photo de couverture : Renaud Lailier