

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 19 avril 2018

**NOTE**  
**d'appui scientifique et technique**  
**de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,**  
**de l'environnement et du travail**

**relatif au projet de plan d'échantillonnage élaboré par Lactalis pour accompagner la reprise de la production de poudres de lait sur le site de Craon**

---

L'Anses a été saisie le 28/03/2018 par la Direction Générale de l'Alimentation pour la réalisation de l'appui scientifique et technique suivant : demande d'AST de l'Anses relative au projet de plan d'échantillonnage élaboré par Lactalis pour accompagner la reprise de la production de poudres de lait sur le site de Craon.

## **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE**

Début décembre 2017, *Salmonella* Agona a été à l'origine d'une épidémie de salmonellose chez des nourrissons ayant consommé des poudres infantiles fabriquées dans l'usine Celia/Lactalis de Craon (53) (37 cas répertoriés à ce jour en France). Ce constat a conduit le préfet de Mayenne à encadrer les conditions d'arrêt et de reprise ultérieure de la production sur ce site. De son côté, l'exploitant a lancé des mesures de nettoyage/désinfection des locaux, ainsi que des travaux d'amélioration de son niveau de maîtrise des risques sanitaires.

Un arrêté préfectoral du 09/12/2017 impose à Lactalis de démontrer l'efficacité de ces mesures avant de pouvoir reprendre sa production. Pour ce faire, Lactalis a transmis à la DDCSPP 53 un plan d'actions qui inclut la description du plan d'échantillonnage qui sera appliqué aux premiers produits qui seront fabriqués, à l'occasion de la reprise de production, d'abord à un stade intermédiaire (prélèvements au pied de la tour de séchage) puis au stade final (prélèvements de boîtes déjà fermées). Un document relatif au plan d'auto-contrôles prévisionnel pour la période de mai à décembre 2018 élaboré par Lactalis est annexé à la présente saisine reçue de la DGAL. Celui-ci porte pour l'essentiel sur le plan d'échantillonnage ainsi que sur les méthodes de détection et de répartition des prélèvements qui seront mis en œuvre au sein de l'usine (ingrédients, matière première, produit semi-fini et produit fini et lingettes).

La saisine vise à recueillir l'avis de l'Anses sur (i) l'efficacité des plans d'auto-contrôles élaborés par Lactalis pour vérifier l'absence de *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. dans les produits et ses éventuelles propositions pour améliorer leur efficacité.

Les questions posées à l'Anses portent sur :

- « La pathogénicité des souches viables mais non cultivables ; »
- « Les critères de performance des méthodes de détection de *Salmonella spp* et *Cronobacter spp.* ; »
- « L'efficacité des plans d'échantillonnage définis pour des lots répondant à un objectif de performance fixé par le fabricant (2ufc/kg dans 2% des lots) ; »
- « La proposition de regrouper des prises d'essai, en fonction des méthodes d'analyses utilisées ; »
- « La probabilité d'obtenir, pour un même échantillon, des résultats différents avec des méthodes d'analyse différentes (méthodes de référence, méthodes alternatives dont PCR) »
- « La possibilité d'optimiser la performance de ces plans d'auto-contrôle. »

## 2. ORGANISATION DES TRAVAUX

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'appui scientifique et technique a été réalisé en interne à l'Anses par des membres du laboratoire de sécurité des aliments – site de Maisons-Alfort (Unité *Salmonella* et *Listeria*) et du laboratoire de Ploufragan (Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Unité Porcins et Unité Epidémiologie et bien-être porcins).

Cet appui scientifique et technique a fait l'objet d'une relecture par trois membres experts du CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » désignés à cet effet.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

## 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS

**Un épisode épidémique analogue avait donné lieu, en mars 2008, à un rapport de l'Afssa portant sur *Salmonella spp* et *Cronobacter* intitulé « contamination microbienne des préparations lactées en poudres destinées aux nourrissons et personnes âgées ».**

### 3.1. Actualisation de l'état des connaissances actuelles au regard des informations produites dans le rapport de l'Afssa publié en 2008<sup>1</sup>

**3.1.1. Le rapport de l'Afssa de 2008 évoque des souches « viables mais non cultivables ». Ces souches ont-elles un pouvoir pathogène ? Dans l'affirmative, dans quelle mesure faut-il les inclure dans la cible à rechercher ?**

- **Formes viables mais non cultivables et pathogénicité**

<sup>1</sup> AFSSA- contamination microbienne des préparations lactées en poudres destinées aux nourrissons et personnes âgées –mars 2008 ; <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-PoudresLait.pdf>

Les bactéries viables mais non cultivables (VBNC) sont des bactéries vivantes, c'est-à-dire métaboliquement actives, mais qui ont perdu transitoirement leur capacité à se multiplier dans ou sur des milieux de culture pour former des colonies (Oliver, 2005, 2010)

Les bactéries VBNC présentent une activité métabolique faible mais elles maintiennent leur intégrité et leur activité cellulaires (Fakruddin, Mannan, & Andrews, 2013). L'expression des gènes est continue, les bactéries répondent aux stimuli externes par l'expression de gènes spécifiques. Le potentiel de membrane est maintenu mais des modifications de la composition en acides gras des membranes cytoplasmiques ont été constatées, tout comme des modifications du profil protéique de la membrane externe. Enfin, il s'avère que le transport des nutriments est réduit et que le taux d'ATP reste élevé. Les bactéries sous forme VBNC montrent généralement une résistance plus importante aux stress que les formes planctoniques (L. Li, Mendis, Trigui, Oliver, & Faucher, 2014).

L'état VBNC a été mis en évidence chez plusieurs espèces pathogènes dont les genres *Cronobacter* (Jameelah, Dewanti-Hariyadi, & Nurjanah, 2018) et *Salmonella* (Aviles, Klotz, Eifert, Williams, & Ponder, 2013; Finn, Condell, McClure, Amézquita, & Fanning, 2013; Gupte, Eriksson De Rezende, & Joseph, 2003; Purevdorj-Gage, Nixon, Bodine, Xu, & Doerrler, 2018), objets de cette saisine.

Des formes VBNC de *Salmonella* ont été observées dans des milieux à faible activité d'eau et/ou après un stress de dessiccation (Eriksson De Rezende, Mallinson, Gupte, & Joseph, 2001; Gruzdev, Pinto, & Sela, 2012; Morishige, Koike, Tamura-Ueyama, & Amano, 2017). Ces formes VBNC jouent sans doute un rôle essentiel dans la survie à long terme de ces deux genres dans l'environnement (Finn et al., 2013; Hu, Yu, & Xiao, 2017).

La pathogénicité des formes VBNC reste cependant controversée. Caro et al. (Caro, Got, Lesne, Binard, & Baleux, 1999) ont montré l'absence de pathogénicité des formes VBNC de *Salmonella* obtenues après un stress aux UV-C. Alors que, plus récemment, il a été montré que les formes VBNC obtenues après l'utilisation de désinfectants présentaient une pathogénicité identique aux formes cultivables (Highmore, Warner, Rothwell, Wilks, & Keevil, 2018).

Toutefois l'importance des VBNC est à relativiser. Que *Salmonella* ou *Cronobacter* n'aient pas été détectés dans les lots impliqués dans des épisodes de cas humains groupés passés peut s'expliquer par les faibles niveaux de contamination et l'hétérogénéité de la contamination (Afssa, 2008; Jongenburger, Reij, Boer, Gorris, & Zwietering, 2011).

*En conclusion partielle sur ce point, comme les cellules bactériennes sous forme VBNC peuvent recouvrer dans certaines conditions leur caractère cultivable et donc leur pathogénicité, il est important de considérer ces formes (L. Li et al., 2014).*

- **Méthodologies permettant de détecter les formes VBNC**

Des méthodes moléculaires indépendantes des méthodes par culture ont été mises au point afin de permettre la détection de cellules VBNC. Certaines méthodes sont basées sur la détection de l'activité métabolique des micro-organismes ou sur leur intégrité membranaire (Fittipaldi, Nocker, & Codony, 2012; Keer & Birch, 2003).

En 2008, l'Afssa avait réalisé un bilan des méthodes basées sur la PCR pour distinguer les différents états physiologiques (Tableau 1). Pour les formes VBNC, un doute subsistait quant à la pertinence des méthodes PCR utilisant au préalable un agent intercalant. Deux agents intercalants sont disponibles : le monoazoture d'éthidium (EMA) (Nogva, Drømtorp, Nissen, & Rudi, 2003) ou le monoazoture de propidium (PMA) (Nocker, Cheung, & Camper, 2006; Pan & Breidt, 2007). Seul l'ADN des cellules dont la membrane est intacte est amplifié lors de la PCR.

Depuis la publication du rapport en 2008, plusieurs études ont montré la pertinence de ces méthodes pour détecter les formes VBNC de *Salmonella* (Barbau-Piednoir et al., 2014; F. Li et al., 2016; Yang et al., 2012). Toutefois ces méthodes ne fonctionnent que pour des niveaux

élevés de contamination qui sont peu compatibles avec les niveaux rencontrés dans les produits industriels, le plus souvent faiblement contaminés. De plus ces méthodes ne sont pas normalisées et n'ont pas fait l'objet d'une validation selon le référentiel NF EN ISO 16140-2 par rapport aux méthodes de référence NF EN ISO 6579-1 : 2017 ou NF EN ISO 22964 : 2017.

**Tableau 1 : Distinction possible entre les états physiologiques des cellules en fonction de la méthode PCR utilisée (adapté de Afssa 2008)**

Etats physiologiques des cellules	PCR seule	PCR +EMA/PMA
<b>Viables et cultivables, avec ou sans revivification</b>	Oui	Oui
<b>Viables non cultivables</b>	Oui	Oui
<b>Mortes</b>	Oui	Non

Conclusions pour la question 1.a :

- La forme viable mais non cultivable (VBNC) est potentiellement rencontrée pour *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. dans l'environnement sec et dans les poudres infantiles sèches sans reprise d' $a_w$  (activité de l'eau). Ces formes sont potentiellement pathogènes.
- Des méthodes couplant marqueurs de viabilité et PCR permettent de détecter ces formes, mais aucune n'est actuellement normalisée et internationalement validée, ni validée comme méthode alternative selon le référentiel NF EN ISO 16140-2. De plus les niveaux de contamination en VBNC semblent peu compatibles avec le niveau de détection élevé de ces méthodes.

Toutefois l'importance des VBNC est à relativiser. Que *Salmonella* ou *Cronobacter* n'aient pas été détectés dans les lots impliqués dans des épisodes de cas humains groupés passés peut s'expliquer par les faibles niveaux de contamination et l'hétérogénéité de la contamination (Afssa, 2008; Jongenburger, Reij, Boer, Gorris, & Zwietering, 2011).

### 3.1.2. Quels sont les principaux critères de performance des méthodes de détection les plus performantes de *Salmonella* spp actuellement sur le marché ?

Les méthodes alternatives commerciales sont actuellement validées une à une en comparaison à la méthode de référence mais ne sont pas comparées entre elles. Le Tableau 2 présente un état des lieux des méthodes de détection alternatives de *Salmonella* spp. ayant fait l'objet d'un processus de validation selon la norme NF EN ISO 16140-2 :2016 « *Microbiologie de la chaîne alimentaire – Validation des méthodes – Partie 2 – Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence* » (ou référentiel antérieur, NF EN ISO 16140, 2003). Le processus de validation, qui mesure les trois critères de performance que sont la sensibilité, le niveau de détection relatif (RLOD) et inclusivité/exclusivité de la méthode, comprend deux étapes : une étude comparative de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence (incluant les étapes de détection et de confirmation des résultats positifs), ainsi qu'une étude inter-laboratoires de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence. Ceci est réalisé pour différentes catégories de matrices en fonction du domaine d'application revendiqué par la méthode alternative. Dans tous les cas, au moins trois types d'aliments différents par catégories doivent être testés et au moins cinq catégories d'aliments sont à tester pour revendiquer une application généralisée à une vaste gamme d'aliments. Une catégorisation est proposée de manière informative dans l'annexe A de la norme NF EN ISO 16140-2. En ce qui concerne la validation de méthodes commerciales menée en France par AFNOR Certification, les données de validation sont fournies dans les dossiers de validation disponibles sur le site <https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/> (marque NF Validation d'AFNOR Certification). Cependant, d'autres méthodes commerciales peuvent être utilisées sur le marché français, à condition d'avoir été validées par d'autres organismes certificateurs (tels que Nordval, Microval et AOAC) prenant comme

référentiel la norme NF EN ISO 16140-2 ou un protocole analogue reconnu internationalement et utilisant les méthodes normalisées CEN/ISO comme méthodes de référence (Article 5 règlement (CE) n°2073/2005).

L'étude comparative des méthodes est la partie du processus de validation effectuée au sein du laboratoire organisateur (laboratoire expert). Elle comprend, pour les méthodes qualitatives :

- **Une étude des méthodes** appariées ou non appariées (sensibilité/spécificité, justesse relative et rapport de faux positifs), c'est-à-dire l'étude comparative des méthodes pour le cas où l'étape initiale du protocole (d'enrichissement) de la méthode de référence et de la méthode alternative est identique (étude de méthodes appariées) et pour le cas contraire (étude de méthodes non appariées).
- **Une étude de sensibilité** : soit une comparaison des résultats de la méthode alternative à ceux de la méthode de référence, obtenus avec l'analyse d'échantillons naturellement et/ou artificiellement) contaminés. Différents types et catégories doivent être soumis à essai à cette fin.
- **Une étude** permettant de déterminer le **niveau de détection relatif** (RLOD) pour des échantillons artificiellement contaminés.
- **Une étude d'inclusivité/d'exclusivité** (souches pures cibles et non cibles) de la méthode alternative. Pour l'étude d'inclusivité, au moins 50 cultures pures de micro-organismes (cibles) doivent être soumises à essai. Pour l'étude d'inclusivité de méthodes concernant les salmonelles, au moins 100 cultures pures de différents sérotypes de *Salmonella* doivent être soumises à essai. Une annexe E de la norme 16140-2 indique les modalités de sélection de ces souches au regard notamment de leur matrice d'origine, leur diversité de caractères d'identification, prévalence ou encore distribution géographique. Pour le cas de *Salmonella* les sérotypes ne sont pas précisément décrits dans ce référentiel mais doivent être sélectionnés au regard des critères cités.
- **Une étude inter-laboratoires**, cette étude vise à déterminer la différence de sensibilité entre la méthode de référence et la méthode alternative lorsque les essais sont effectués par différents collaborateurs utilisant des échantillons identiques (conditions de reproductibilité). Elle permet de calculer le pourcentage de spécificité (SP) de la méthode de référence et de la méthode alternative.
- **Pour chacun de ces paramètres, la norme NF EN ISO 16140-2 définit des limites d'acceptabilité.**

De surcroît, une étude inter-laboratoires est effectuée afin de (i) comparer les performances de la méthode alternative à celles de la méthode de référence appliquées par différents laboratoires en utilisant des échantillons identiques examinés dans des conditions de reproductibilité, et (ii) comparer ces résultats aux critères préétablis pour la différence acceptable entre la méthode de référence et la méthode alternative.

Le référentiel de validation des méthodes alternatives NF EN ISO 16140-2 ayant fait l'objet d'une récente révision (2016), les critères de performances ont quelque peu évolué, des limites d'acceptabilité ont été introduites. Les Tableaux n°5 et n°6 du rapport Afssa 2008 doivent être amendés en conséquence tant pour la liste des méthodes validées que pour les critères de performance présentés, leurs limites d'acceptabilité et leurs modalités d'emploi (taille de la prise d'essai par exemple) ; au regard de la durée de validité des certificats de validation, certains d'entre eux font référence à la précédente version du référentiel normatif NF EN ISO 16140 (2003). Par ailleurs, la norme 6579-1 prise comme référence a été révisée en 2017 : des certificats de validation peuvent donc actuellement faire référence à une comparaison entre des méthodes alternatives et la version antérieure de la norme. Néanmoins, les modifications entre l'ancienne et la nouvelle version ont été considérées comme ayant un impact mineur. Les



méthodes alternatives actuellement validées n'ont donc pas eu besoin d'être entièrement revalidées selon le protocole 16140—2.

La limite d'acceptabilité (AL) pour des données d'étude de méthodes appariées est établie à 1,5, ce qui signifie que le niveau de détection (LOD, limite de détection) de la méthode alternative ne doit pas être supérieur de plus de 1,5 fois la LOD de la méthode de référence. La limite AL pour des données d'étude de méthodes non appariées est établie à 2,5.

Afin de pouvoir disposer d'un tableau exhaustif et actualisé, il est nécessaire de se rapprocher des organismes de certification qui doivent pouvoir fournir de manière synthétique les caractéristiques de performance des méthodes ayant été validées (NF Validation d'AFNOR Certification et MicroVal® du NEN).

Conclusions pour la question 1.b :

Les principaux critères de performance des méthodes de détection de *Salmonella* spp, et plus largement des méthodes de détection dans le domaine de la microbiologie de la chaîne alimentaire, sont définis par le référentiel NF EN 16140-2 :2016.

Ces critères comportent :

- Une comparaison des méthodes (sensibilité/spécificité, justesse, rapport de faux positifs) ;
- Une étude de niveau relatif de détection ;
- Une étude d'inclusivité/d'exclusivité.

Les méthodes commerciales alternatives sont validées via la NF EN ISO 16140-2 en comparaison à la méthode normalisée correspondante, NF EN ISO 6579-1 pour la détection de *Salmonella*. Cela est réalisé sur des catégories alimentaires correspondant au domaine d'application revendiqué par la méthode alternative (cf Annexe A de la norme 16140-2).

Les caractéristiques de performance pour les méthodes alternatives VIDAS® Easy *Salmonella* et GENE-UP® *Salmonella* sont indiquées dans les réponses aux questions en 3.3.2 et en 3.3.3.

Fournir l'ensemble des caractéristiques de performance des autres méthodes commerciales validées NF EN ISO 16140-2, et potentiellement utilisables sur le marché français, nécessiterait un travail approfondi et l'implication des organismes de certification AFNOR Certification et MicroVal NEN (voire même NordVal et AOAC).

## Appui scientifique et technique de l'Anses

Demande n° « 2018-SA-0077 »

**Tableau 2 : Présentation des méthodes de détection alternatives de *Salmonella* spp. ayant fait l'objet d'un processus de validation selon la norme NF EN ISO 16140-2 :2016, validées AFNOR**

MILIEUX DE CULTURE			
<p><b>IBISA</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioMérieux</p> <p><b>SALMA One Day</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : bioMérieux</p>	<p><b>IRIS <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : SOLABIA S.A.S.</p> <p><b>Salmonella PRECIS</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : OXOID Ltd, Part of Thermo Fisher Scientific</p>	<p><b>RAPID<sup>®</sup> <i>Salmonella</i>/Gélose</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BIO-RAD</p> <p><b>SESAME <i>Salmonella</i> Test</b> Détection des <i>Salmonella</i> mobiles Titulaire : SOLABIA S.A.S.</p>	<p><b>Simple Method for <i>Salmonella</i> (SMS)</b> Détection des <i>Salmonella</i> mobiles Titulaire : BioMérieux</p> <p><b>Pathatrix Auto <i>Salmonella</i> spp Kit Linked to Selective Agar Detection</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. (IMS + Milieu gélosé) Titulaire : Life Technologies Corporation, Part of Thermo Fisher Scientific</p>
METHODES MOLECULAIRES			
<p><b>AdiaFood <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioMérieux</p> <p><b>BAX System PCR Assay <i>Salmonella</i> spp</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : Qualicon Diagnostics LLC.</p> <p><b>GeneDisc <i>Salmonella</i> spp.</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : Pall GeneDisc Technologies</p> <p><b>QIAGEN mericon <i>Salmonella</i> spp.</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : Qiagen GmbH</p> <p><b>Thermo Scientific RapidFinder <i>Salmonella</i> species, Typhimurium et Enteritidis Multiplex PCR Kit</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp., <i>Salmonella</i> Typhimurium et <i>Salmonella</i> Enteritidis Titulaire : OXOID Ltd, Part of Thermo Fisher Scientific</p>	<p><b>Assurance GDS <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioControl Systems</p> <p><b>DuPont BAX System Real-Time PCR Assay for <i>Salmonella</i> spp.</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : Qualicon Diagnostics LLC.</p> <p><b>GENE-UP <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioMérieux</p> <p><b>Test 3M de détection moléculaire des <i>Salmonelles</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : 3M Health Care</p>	<p><b>BACGene <i>Salmonella</i> spp</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : Eurofins GeneScan GmbH</p> <p><b>iQ-Check <i>Salmonella</i> II</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BIO-RAD</p> <p><b>HQS <i>Salmonella</i> spp Sybr</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : ADNucleis</p> <p><b>Test 3M de détection moléculaire 2 – <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : 3M Health Care</p>	<p><b>NEOGEN ANSR <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : NEOGEN Europe Ltd</p> <p><b>MicroSEQ <i>Salmonella</i> spp.</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. (excepté <i>Salmonella</i> Bongori) Titulaire : Life Technologies Corporation, Part of Thermo Fisher Scientific</p> <p><b>Pathatrix Auto <i>Salmonella</i> spp Kit Linked to MicroSEQ <i>Salmonella</i> spp. Detection Kit</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. (IMS + PCR) Titulaire : Life Technologies Corporation, Part of Thermo Fisher Scientific</p> <p><b>Thermo Scientific SureTect <i>Salmonella</i> species PCR Assay</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : OXOID Ltd, Part of Thermo Fisher Scientific</p>
TESTS IMMUNOLOGIQUES			
<p><b>RapidChek SELECT <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. (excepté <i>Salmonella</i> du groupe O:18) Titulaire : Romer Labs Inc.</p> <p><b>VIDAS Easy <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioMérieux</p> <p><b>Solus <i>Salmonella</i> ELISA</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : Solus Scientific Solutions Ltd</p>	<p><b>Reveal <i>Salmonella</i> 2.0</b> Détection des <i>Salmonella</i> du groupe A (excepté <i>Salmonella</i> Paratyphi A) au groupe E Titulaire : NEOGEN Europe Ltd</p> <p><b>VIDAS <i>Salmonella</i> – Simple voie (SLM)</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioMérieux</p> <p><b>TAG 24 <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioControl Systems</p>	<p><b>RIDASCREEN <i>Salmonella</i></b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : R-Biopharm</p> <p><b>VIDAS <i>Salmonella</i> – Double voie (SLM)</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioMérieux</p> <p><b>Transia Plate <i>Salmonella</i> Gold</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioControl Systems</p>	<p><b>SalmoPresto PE</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : Prestodiag</p> <p><b>VIDAS Up <i>Salmonella</i> (SPT)</b> Détection de <i>Salmonella</i> spp. Titulaire : BioMérieux</p>

**3.1.3. Question 1c : Quels sont les principaux critères de performance des méthodes de détection les plus performantes de *Cronobacter* spp. actuellement sur le marché ?**

Le Tableau 3 présente un état des lieux des méthodes de détection alternatives de *Cronobacter* spp. ayant fait l'objet, tout comme pour *Salmonella* spp., d'un processus de validation selon la norme NF EN ISO 16140-2 :2016. Ce tableau fait uniquement référence aux méthodes validées par la marque AFNOR certification selon le référentiel 16140-2. Les données sont issues des dossiers de validation disponibles sur le site <https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/> (marque NF Validation d'AFNOR certification). Cependant, d'autres méthodes commerciales peuvent être utilisées sur le marché français à condition d'avoir été validées par d'autres organismes certificateurs (tels que Nordval, Microval et AOAC) prenant comme référentiel la norme NF EN ISO 16140-2 ou un protocole analogue reconnu internationalement et utilisant les méthodes normalisées CEN/ISO comme méthodes de référence (Article 5 règlement (CE) n°2073/2005). Les méthodes alternatives sont validées via la NF EN ISO 16140-2 en comparaison à la méthode normalisée NF EN ISO 22964 (*Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détection de Cronobacter* spp., version de 2006 ou version révisée et internationalement validée de 2017). Les critères de performances sont définis dans la NF EN ISO 16140-2 et sont identiques à ceux présentés précédemment pour *Salmonella* spp.

Conclusions pour la question 1.c :

Les critères de performance des méthodes de détection de *Cronobacter* spp sont définis par le référentiel NF EN ISO 16140-2 :2016 et sont les mêmes que ceux cités pour *Salmonella* spp.

Les méthodes alternatives sont validées via ce référentiel en comparaison à la méthode normalisée NF EN ISO 22964 (version 2006 ou 2017).

Fournir l'ensemble des caractéristiques de performance des autres méthodes commerciales validées NF EN ISO 16140-2, et potentiellement utilisables sur le marché français, nécessiterait un travail approfondi et l'implication des organismes de certification AFNOR Certification et MicroVal NEN (voire même NordVal et AOAC).



**Tableau 3 : Présentation des méthodes de détection alternatives de *Cronobacter* spp. ayant fait l'objet d'un processus de validation selon la norme NF EN ISO 16140-2 :2016, validées AFNOR.**

MILIEUX DE CULTURE			
<b>ESIA One Day</b> Type de méthode : Détection des <i>Cronobacter</i> spp Titulaire : BioMérieux		<b>RAPID'Sakazakii/Gélose</b> Type de méthode : Détection des <i>Cronobacter</i> spp Titulaire : BIO-RAD	
METHODES MOLECULAIRES			
<b>ADIAFOOD <i>Cronobacter</i> spp</b> Type de méthode : PCR – Détection des <i>Cronobacter</i> spp Titulaire : BioMérieux	<b>GENE-UP <i>Cronobacter</i> spp</b> Type de méthode : PCR – Détection des <i>Cronobacter</i> spp Titulaire : BioMérieux	<b>HQS <i>Cronobacter</i> spp Sybr</b> Type de méthode : Détection des <i>Cronobacter</i> spp Titulaire : ADNucleis	<b>iQ-Check <i>Cronobacter</i> spp</b> Type de méthode : Détection des <i>Cronobacter</i> spp Titulaire : BIO-RAD
<b>Thermo Scientific SureTect <i>Cronobacter</i> species PCR Assay</b> Type de méthode : Détection des <i>Cronobacter</i> spp Titulaire : Oxoid Thermo Fisher Scientific	<b>Test 3M de Détection Moléculaire 2 – <i>Cronobacter</i></b> Type de méthode : Détection des <i>Cronobacter</i> spp Titulaire : 3M Health Care		

### 3.2. L'exploitant souhaite détecter 95% des lots contaminés par *Salmonella spp* avec une concentration de 2ufc/kg dans 2% du lot

#### 3.2.1. : Question 2.a : Quelle est la performance d'un plan de prélèvement automatique basé sur une prise de 15 g toutes les 20 secondes, soit tous les 28 kg de poudre produite ?

La performance d'un plan de prélèvement est mesurée par sa probabilité de détection, c'est-à-dire la probabilité que le nombre de résultats positifs soit supérieur ou égal à un. L'exploitant souhaite détecter 95% des lots contaminés. Pour la suite des calculs, on fait l'hypothèse que la sensibilité et la spécificité des analyses microbiologiques sont parfaites (égales à 1). Le calcul de la performance du plan de prélèvement dépend de six paramètres (Afssa, 2008; Habraken & Mossel, 1986) :

1.  $N_c$  : Densité de contamination (en nombre d'unités formant colonies/ufc par kg), ici égale à 2 (ufc/kg) ;
2.  $P_c$  : Proportion de zone contaminée du lot, ici égale à 0,02 (2% du lot est considéré contaminé),
3.  $N_p$  : Nombre de prélèvements (réalisé par heure), égal à 180. En effet, un prélèvement toutes les 20 s revient à 180 prélèvements par heure. En considérant le nombre de prélèvements par heure, la masse du lot n'a plus besoin d'être considérée ;
4.  $M_p$  : Masse de l'échantillon (en kg), égale à 0,015 kg ;
5.  $N_a$  : Nombre d'échantillons regroupés, égal à 1 ;
6.  $P_a$  : Proportion de préparation en poudre pour nourrissons analysée, égale à 1 (c. à. d. signifie que tout l'échantillon est analysé).

Pour évaluer la performance du plan de prélèvement, il convient de prendre en compte l'ensemble de ces paramètres ainsi que leurs interactions. La méthode est basée sur 10 000 simulations mimant la réalité décrite par les six paramètres. La probabilité de détection est basée sur une loi binomiale dont les paramètres sont le nombre d'ufc dans le lot (c. à. d. masse du lot \*  $N_c$ ) et la probabilité de détection d'un prélèvement positif (qui dépend de la masse du lot,  $P_c$ ,  $N_p$ ,  $M_p$ ,  $N_a$  et  $P_a$ ). Le programme Afssa2008.R issu du travail collectif (Afssa, 2008) [cf. Annexe1] permet ce calcul. Il est appliqué sur les valeurs des six paramètres ci-dessus. La probabilité de détection de *Salmonella spp.* est de :

$$\text{Proba}(\text{Salmonella} \geq 1) = \mathbf{0,994}$$

Il s'ensuit que l'on a 99,4% de chance de détecter *Salmonella spp.* pour une heure de production selon le plan de contrôle défini par les six paramètres précédents.

Il convient de noter que, si la densité de contamination (c. à. d.  $N_c$ ) diminue, la performance du plan se dégradera, comme illustré par la Figure 1.

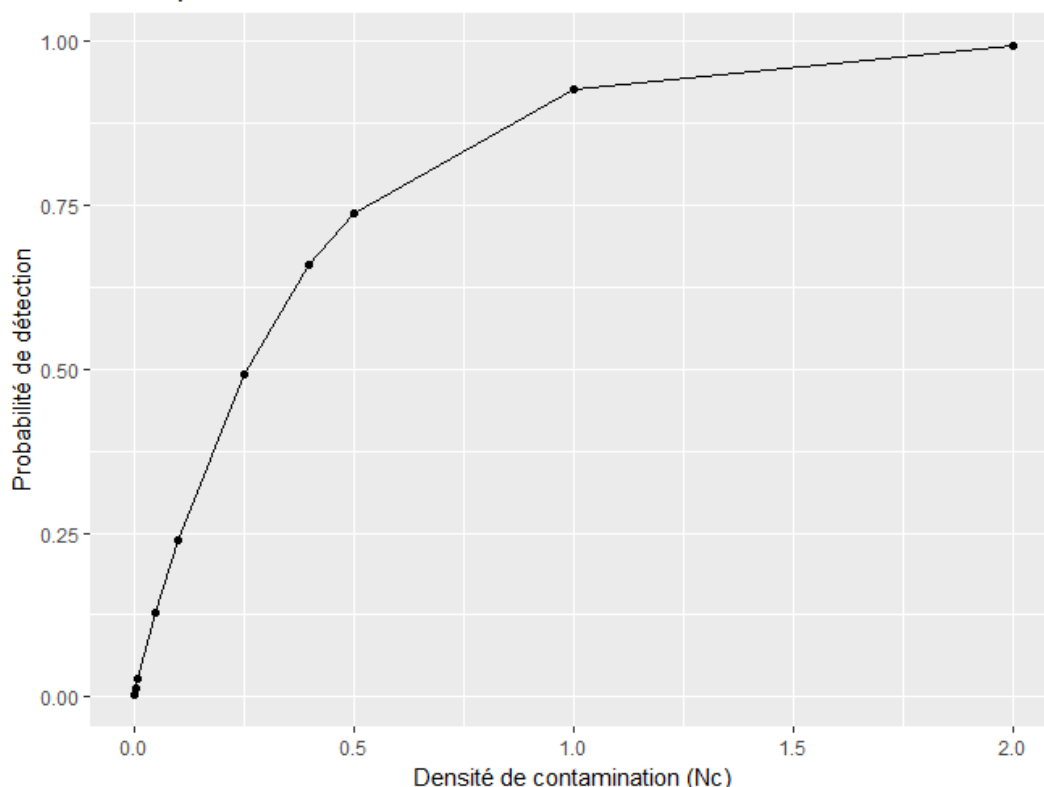


Figure 1 : Influence de la densité de contamination par *Salmonella* spp. sur la probabilité de détection sur produit prélevé en cours de production.

Conclusion pour la question 2a :

Le plan de prélèvement proposé par l'exploitant permet de détecter, avec une probabilité supérieure à 95%, une concentration de 2 ufc/kg dans 2% du lot.

**3.2.2. Question 2.b : La masse des lots de produits finis peut varier entre 20 et 100 tonnes ; quelle est la performance de plans d'échantillonnage indépendants de cette masse, basés respectivement sur le prélèvement d'échantillons de 25g dans 30, 150, 180 voire 240 boîtes par lot ?**

La réponse à la question 2b est établie selon la même méthode que celle employée pour la question 2a. La performance du plan de prélèvement est calculée selon les six paramètres suivants :

1.  $N_c$  : Densité de contamination (en nombre d'unités formant colonies (ufc)/kg), ici égale à 2 (ufc/kg) ;
2.  $P_c$  : Proportion de zone contaminée du lot, ici égale à 0,02 (2% du lot est considéré contaminé) ;
3.  $N_p$  : Nombre d'échantillons (30, 150, 180 ou 240) ;
4.  $M_p$  : Masse de l'échantillon (en kg), égale à 0,025 kg ;
5.  $N_a$  : Nombre d'échantillons regroupés, égal à 1 ;
6.  $P_a$  : Proportion de préparation en poudre pour nourrissons analysée, égale à 1 (c.à.d que tout l'échantillon est analysé).

Le même programme est appliqué sur les valeurs des six paramètres ci-dessus. Les probabilités de détection de *Salmonella* spp. sont données dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : Probabilité de détection de *Salmonella* spp. présente à 2ufc/kg dans 2% du lot pour un plan de prélèvement sur produit fini de 25 g dans Np=(30, 150, 180, 240) boîtes par lot.**

	Np=30	Np=150	Np=180	Np=240
<b>Proba(<i>Salmonella</i> ≥ 1) =</b>	0.553	0.999	1.00	1.00

Il s'ensuit que l'on a 55.3% (resp. 99.9%, 100%, 100%) de chance de détecter *Salmonella* spp. si 30 (resp. 150, 180, 240) boîtes sont prélevées, selon le plan de contrôle défini par les six paramètres précédents

Conclusion pour la question 2b :

Le plan de prélèvement proposé par l'exploitant permet de détecter avec une probabilité supérieure à 95% une concentration de 2 ufc/kg si 150, 180 ou 240 boîtes sont prélevées. Par contre, un plan de prélèvement de 30 boîtes par lot ne le permet pas.

### 3.2.3. Question 2.c : Un objectif comparable peut –il être fixé pour la détection de *Cronobacter* spp. au regard des performances des méthodes d'analyse disponibles ?

Le mode d'introduction de *Cronobacter* spp. dans les ateliers de production étant vraisemblablement proche de celui de *Salmonella*, les hypothèses retenues pour la modélisation de la contamination par *Salmonella* sont valables pour *Cronobacter* spp. De plus, les niveaux de contamination envisagés pour *Cronobacter* sont, comme pour *Salmonella*, vraisemblablement faibles (Jongenburger et al., 2011).

Sous réserve que les méthodes analytiques employées pour la détection de *Cronobacter* spp. aient des performances équivalentes à celles utilisées pour la détection de *Salmonella* spp., il peut être considéré que la performance du plan de prélèvement de *Cronobacter* spp. est équivalente à celle de *Salmonella* spp.

Conclusion pour la question 2c :

Les caractéristiques de contamination de *Cronobacter* spp. étant vraisemblablement proche de celles de *Salmonella* spp., et considérant des méthodes analytiques de performance équivalente, il peut être considéré que l'efficacité des plans de contrôle sera similaire pour *Cronobacter* spp.

### 3.3. L'exploitant propose de regrouper les prises d'essais par 15 (15 x 25g = 375g) voire par 45 (45 x 15 g = 675 g dont 375 g seulement seraient analysés)

#### 3.3.1. Question 3.a : Compte tenu des très faibles concentrations en bactéries recherchées, ces regroupements peuvent-ils conduire à augmenter le nombre de faux négatifs lorsque l'analyse est conduite selon la méthode de référence ISO 6579-1 ?

La norme NF EN ISO 6579-1 portant sur la détection de *Salmonella* « *Microbiologie de la chaîne alimentaire – Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage de Salmonella – Partie 1 : recherche des Salmonella spp* » (avril 2017), précise en son paragraphe 9.1 « *Prise d'essai et suspension mère* » que : « *Le présent document a été validé pour des prises d'essai de 25 g. L'utilisation d'une prise d'essai plus petite est autorisée sans validation ou vérification supplémentaire, dans la mesure où le rapport entre le bouillon de pré-enrichissement et la prise d'essai demeure le même. Il est admis d'utiliser une prise d'essai plus importante que celle validée à l'origine si une*

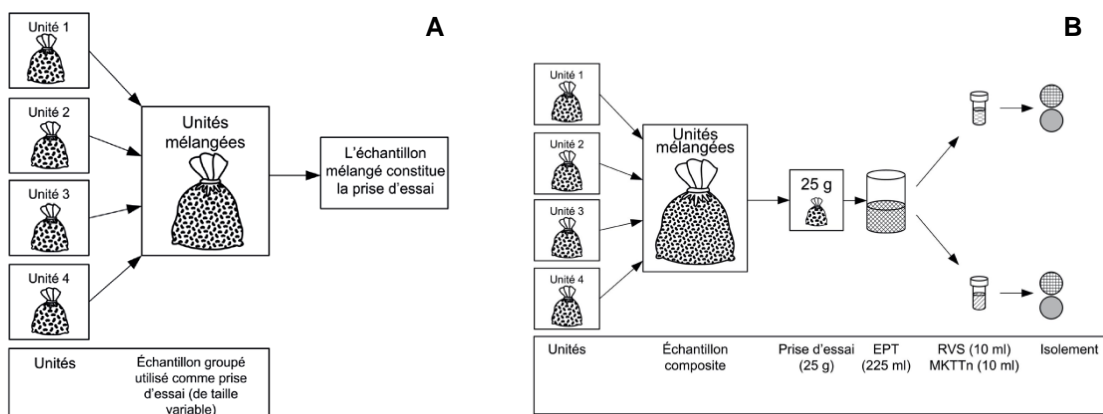
**étude de validation/vérification a démontré l'absence d'effets négatifs sur la détection de *Salmonella* spp. »**

Une note précise dans ce même paragraphe que la vérification du regroupement d'échantillons peut être effectuée conformément au protocole décrit dans la norme NF EN ISO 6887-1 :2017 en annexe D. Toutes les opérations doivent être vérifiées avant leur utilisation afin de prouver que la probabilité d'obtenir des faux négatifs n'a pas augmenté.

Cette norme NF EN ISO 6887-1<sup>2</sup> présente les modalités de mises en œuvre à observer lors de la reconstitution d'échantillons de même type (Figure 2), lors du regroupement d'échantillons du même type ou encore du regroupement de plusieurs prises d'essai après la phase d'enrichissement du protocole de recherche. L'annexe A de cette norme illustre ces différents cas et leur mise en œuvre. En appui à cette norme, la NF EN ISO 6887-5<sup>3</sup>, spécifique aux produits laitiers, présente les modalités de préparation de la suspension mère de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai.

Lorsque plusieurs unités d'un aliment spécifique doivent être testées, il a déjà été suggéré de les combiner pour former une prise d'essai groupée (Figure 2). Cette manipulation n'est valable qu'à condition que ce regroupement n'affecte pas la sensibilité de la méthode, soit le nombre de faux négatifs dans les différentes matrices analysées. Dans le cas de *Salmonella* spp., les méthodes validées par AFNOR Certification décrivent une prise d'essai de 25 g ou 375 g. Lorsque celles-ci sont validées pour un échantillon analysé de 375 g, l'analyse peut être effectuée en conséquence sur un échantillon issu d'un regroupement d'unité ou issu d'une reconstitution d'unité avec un maximum de 375 g.

Dans le cas de la reconstitution mentionnée de 45 X 15 g = 675 g dont 375 g seulement seraient analysés, la méthode sera valide pour analyser cette fraction de 375 g mais elle ne répondra pas à la notion de représentativité de la masse de 375 g au regard des 675 g initiaux. Cette représentativité des 375 g au regard des 675 g initiaux doit faire l'objet d'une évaluation statistique en amont. Toutefois, en première approche, on peut supposer que c'est au moins aussi efficace que « faire » 25 X 15 g.



**Figure 2 : Extrait de la norme NF EN ISO 6887-1. Schéma de regroupement d'échantillons (A), schéma de reconstitution d'échantillons (B).**

<sup>2</sup> Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

<sup>3</sup> Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 5 : règles spécifiques pour la préparation du lait et des produits laitiers



Récemment, Tomàs Fornés et coll. (Tomás Fornés, McMahon, Moulin, & Klijn, 2017) ont mis en évidence, pour cinq méthodes alternatives de détection distinctes, utilisant différentes technologies PCR en point final, ELISA et PCR en temps réel (dont la méthode VIDAS Easy SLM), que le regroupement d'échantillons alimentaires jusqu'à 375 g était valide pour la détection de *Salmonella spp.* Les RLOD50 (niveau de détection relatif 50%) pour 22 des aliments testés (dont des préparations en poudre pour nourrissons) étaient considérées acceptables (inférieures à 2,5) en comparant la taille de la prise d'essai de référence (25 g) à la taille de la prise d'essai regroupée (375 g), à condition que le bouillon d'enrichissement ait été préchauffé et le temps d'incubation maximum respecté. Néanmoins, sur l'ensemble des méthodes testées dans cette publication, seule la méthode VIDAS® Easy *Salmonella* (bioMérieux), est proposée par l'industriel dans le cadre du plan de contrôle et le protocole testé ne correspond qu'au cas de regroupement de prises d'essai (la recombinaison d'échantillons n'a pas été testée).

Conclusions pour la question 3.a :

Afin de vérifier que le regroupement d'échantillon formant une prise d'essai totale de 375 g (proposition «15 X 25 g = 375 g») ou encore la recombinaison d'échantillons (proposition «45 X 15 g = 675 g dont 375 g seulement seraient analysés ») puisse s'appliquer sur les matrices de poudre de lait infantile et préparations en poudre pour nourrissons, il est nécessaire que les études décrites plus haut (annexe D de la norme NF EN ISO 6887-1) soient conduites ou que des données équivalentes soient fournies pour justifier cette mise en œuvre dans le cadre d'une utilisation de la méthode normalisée NF EN ISO 6579-1.

### 3.3.2. Question 3.b : Même question lorsque l'analyse est conduite selon une méthode alternative (l'exploitant propose la méthode Vidas Easy Salmonella) ?

La méthode VIDAS® Easy *Salmonella* a fait l'objet d'une validation selon le référentiel NF EN ISO 16140-2 (certificat n° BIO 12/16 – 09/05). Cette méthode a fait l'objet d'une extension en novembre 2017 pour l'analyse de lait en poudre et formules infantiles avec et sans probiotique dans une prise d'essai de 375 g (parmi lesquels ont été testées les formules infantiles avec et sans probiotique). Pour cette catégorie alimentaire, la sensibilité de la méthode alternative et de la méthode de référence (NF EN ISO 6579-1) sont respectivement de 0,969 et 1 (Tableau 6). La RLOD50 (niveau de détection relatif 50%) entre la méthode alternative et la méthode de référence est de 1, conforme à la limite d'acceptation haute de 1,5 selon le référentiel NF EN ISO 16140-2. Ces valeurs ont été obtenues sur un panel de 62 échantillons, dont un a engendré un résultat faussement négatif avec la méthode alternative, respectant néanmoins les critères d'acceptation de la norme NF EN ISO 16140-2 pour ce niveau de faux négatif et pour une seule catégorie alimentaire (étude appariée : ND1-PD2 ≤ 3 et ND+PD ≤ 3).

Lors de cette étude de validation, la méthode de référence a été réalisée sur la même taille de prise d'essai, à savoir 375 g.

Conclusions pour la question 3.b :

La méthode Vidas® Easy *Salmonella* peut être appliquée sur des échantillons regroupés (15x25 g) sans augmenter significativement la proportion de faux-négatifs.

### 3.3.3. Question 3.c : Même question lorsque l'analyse est conduite selon une méthode utilisant la PCR (l'exploitant propose la méthode PCR GeneUp) ?

La méthode GENE-UP® *Salmonella* a fait l'objet d'une validation selon le référentiel NF EN ISO 16140-2 (certificat n° BIO 12/38 – 06/16). Cette méthode a fait l'objet d'une extension en septembre 2016 pour l'analyse du lait et des produits laitiers (à l'exception des produits à base de lait

cru) pour une prise d'essai de 25 g. Des formules infantiles et céréales avec probiotiques ont été testés dans le cadre d'une extension de certification pour les « produits spécifiques ». Pour cette catégorie alimentaire la sensibilité de la méthode alternative et celle de la méthode de référence (NF EN ISO 6579-1) sont respectivement de 0,60 et 0,90 (Tableau 6).

Cette méthode alternative n'a pas été validée avec un regroupement ou recombinaison d'échantillons.

Conclusions pour la question 3.c :

Pour la méthode PCR GeneUp® *Salmonella*, les données actuelles ne permettent pas de conclure si le regroupement des échantillons conduirait à augmenter le nombre de faux-négatifs par rapport à une analyse qui serait conduite dans les mêmes conditions de regroupement des échantillons selon la méthode de référence NF EN ISO 6579-1

Tableau 6 : Résumé des caractéristiques de performance des méthodes alternatives (VIDAS® Easy *Salmonella* et GeneUp® *Salmonella*) après validation par AFNOR Certification

Méthode alternative	Taille prise d'essai	Catégorie matricielle	Matrice	PA	NA	PD	ND	PPND	PPNA	N d'échantillons testés	Sensibilité alt [SE <sub>alt</sub> ] (16140-2:2016) [(PA+PD)/(PA+ND+PD)]	Sensibilité ref [SE <sub>ref</sub> ] (16140-2:2016) [(PA+ND)/(PA+ND+PD)]	Justesse relative [RT] (16140-2:2016) [(PA+NA)/N]	RLOD (LOD <sub>50 alt</sub> / LOD <sub>50 ref</sub> )	Concordance avec la méthode de référence (selon 16140-2:2016)
VIDAS® Easy <i>Salmonella</i>	25g	Produits laitiers	Lait en poudre	10	16	0	0	0	0	26	100,0%	100,0%	100,0%	1	OK
	375g	Lait en poudre	Lait en poudre + formules infantiles avec et sans probiotiques	31	30	0	1	0	0	62	96,9%	100,0%	98,4%	1	OK
GeneUp® <i>Salmonella</i>	25g	Lait et produits laitiers (sauf produit à base de lait cru)	Lait en poudre	5	10	1	4	0	0	20	60,0%	90,0%	75,0%	0,713	OK

**3.3.4. Question 3.d : Même question avec les méthodes d'analyse disponibles pour *Cronobacter* spp. ?**

La littérature scientifique indique que le regroupement d'échantillons affecte les performances des méthodes analytiques de détection en augmentant le nombre de faux négatifs. (Rabeb Miled-Bennour et al., 2011; Rabeb Miled-Bennour et al., 2010).

Comme pour *Salmonella* spp., la vérification des conséquences du regroupement d'échantillons sur la performance des méthodes de détection (de la méthode de référence ou des méthodes alternatives listées dans le Tableau 3) doit être effectuée conformément au protocole décrit dans la norme NF EN ISO 6887-1 :2017 en annexe D.

Conclusions pour la question 3.d :

La littérature scientifique met en évidence des difficultés du regroupement des échantillons dans le cadre de la détection de *Cronobacter*.

Seule une étude de validation/vérification du regroupement d'échantillons selon le protocole de la norme NF EN ISO 6887-1 :2017(Annexe D) permettrait de caractériser quantitativement les conséquences sur le taux de faux négatifs du regroupement d'échantillons.

**3.4. Question 4 : Quelle est la probabilité que l'analyse d'un même échantillon selon des méthodes différentes (de référence, alternatives ou PCR) conduisent à des résultats différents ?**

Deux facteurs peuvent conduire à des différences de résultats entre les méthodes. Le premier concerne la différence de performance (sensibilité, spécificité ou niveau de détection) entre les méthodes employées. L'autre est relatif à l'hétérogénéité, aux faibles niveaux de concentration de la contamination dans la matrice alimentaire et la prise d'essai.

Si l'on considère la même prise d'essai et la réalisation d'une recherche de l'agent pathogène à partir du même milieu d'enrichissement, les différences de résultats sont le reflet de la différence de performance des méthodes analytiques.

Le test de Kappa (Landis & Koch, 1977) a été utilisé pour comparer chacune des méthodes alternatives (Vidas® Easy *Salmonella* et PCR GeneUp®) à la méthode de référence. Selon les valeurs indiquées dans le Tableau 6, l'indice de concordance est de :

- 0,97 pour la méthode VIDAS® Easy *Salmonella* appliquée aux catégories de produits lait en poudre et préparation infantiles (sur des échantillons de 375 g),
- 0,48 pour la méthode GeneUp® *Salmonella*, appliquée à catégorie de produit lait en poudre.

Sur la base de ces valeurs, la concordance avec la méthode de référence peut être qualifiée, selon l'échelle de (Landis & Koch, 1977), de « presque parfaite » pour la méthode VIDAS® Easy *Salmonella* et « modérée » pour la méthode GeneUp® *Salmonella*.

Sur la base des données de validation, la probabilité d'obtenir des résultats différents de la méthode de référence est de 1,6% pour la Vidas Easy *Salmonella* et de 25% pour la méthode GeneUp® *Salmonella*.

Conclusions pour la question 4 :

Sur la base des résultats de performance des méthodes alternatives, la probabilité d'obtenir des résultats différents pour une prise d'essai issue d'un même échantillon entre la méthode de référence et la méthode VIDAS® Easy *Salmonella* ou avec la méthode GeneUp® *Salmonella* est respectivement de 1,6% et de 25%.

### 3.5. Question 5 : Plus généralement, quelles pistes pourraient être envisagées pour optimiser la performance de ces plans d'auto-contrôles ?

Indépendamment de la taille du lot, les deux paramètres critiques pour optimiser le plan d'échantillonnage sont d'une part la masse de l'échantillon et d'autre part le nombre de prélèvements.

Le Tableau 7 présente l'impact de la masse de l'échantillon prélevé (Mp=15g, 25g, 50g, 75g, 100g) ainsi que le nombre de prélèvements (50, 70, 90, 110, 150) sur les probabilités de détection de *Salmonella* spp. selon les valeurs de ces deux paramètres, en considérant que la bactérie est présente à 2 ufc/kg dans 2% du lot.

**Tableau 7 : Probabilité de détection de *Salmonella* spp présente au niveau de 2 ufc/kg dans 2% du lot pour un plan de prélèvement au stade produit fini de Mp=(15g, 25g, 50g, 75g, 100g) dans Np=(50, 70, 90, 110, 150) boîtes.**

	Np=50 boîtes	Np=70 boîtes	Np=90 boîtes	Np=110 boîtes	Np=150 boîtes
Mp=15g	0,777	0,847	0,913	0,958	0,989
Mp=25g	0,919	0,949	0,978	0,995	1,00
Mp=50g	0,994	0,997	0,999	1,00	1,00
Mp=75g	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Mp=100g	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

De plus, les recommandations de l'avis Afssa de 2008 donnent des pistes pour mieux définir le plan de contrôles microbiologiques. Le contrôle microbiologique de chaque lot de produits finis avec la recherche de pathogènes n'est pas suffisant à lui seul pour garantir la sécurité (Afssa, 2008; Zwietering, Jacxsens, Membré, Nauta, & Peterz, 2016). Les prélèvements environnementaux sont indispensables et complémentaires aux contrôles microbiologiques sur produits finis (Afssa, 2008). Au-delà des flores pathogènes, le plan d'auto-contrôles devrait inclure les flores indicatrices d'hygiène comme les *Enterobacteriaceae* (Afssa, 2008; Beuchat et al., 2013).

Le suivi temporel sur de longues périodes (carte de contrôle, moyenne mobile) des différentes flores microbiologiques dans les produits finis et l'environnement de production est un outil utile pour aider à la détection d'une perte de contrôle de l'hygiène de production, comme préconisé dans le règlement (CE) n°2073/2005.

Enfin la constitution d'« échantillothèques » de préparations en poudre pour nourrissons et de collections de souches de *Salmonella* et *Cronobacter* peut s'avérer un outil précieux pour l'opérateur afin d'identifier l'origine de la contamination des lots de produit fini.

#### Conclusions pour la question 5 :

La performance des plans d'auto-contrôle dépend directement des masses et de la fréquence de prélèvements. Le script donné dans l'annexe 1 peut être utilisé sous la responsabilité de l'industriel pour calculer l'efficacité d'autres plans de contrôle pour *Salmonella* ou *Cronobacter* spp.

Plus généralement, une attention particulière devrait être portée aux flores indicatrices de l'hygiène des procédés et aux contrôles microbiologiques réalisés dans l'environnement de production.

A ce titre, il convient de rappeler la conclusion du rapport de de l'Agence en date de Mars 2008 qui portait sur la contamination microbienne des préparations lactées en poudres destinées aux nourrissons et personnes âgées :

« 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 de *Cronobacter* spp. et de *Salmonella* spp a une importance aussi grande. »

Dr Roger Genet

---

## MOTS-CLES

Poudres de laits infantiles ; *Salmonella* spp. ; *Cronobacter* spp. ; Plan échantillonnage

## BIBLIOGRAPHIE

- Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires
- NF EN ISO 16140-2 (2016) - Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence
- NF EN ISO 6887-1 (2017) - Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 1 : règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales
- NF EN ISO 6887-5 (2010) Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 5 : règles spécifiques pour la préparation du lait et des produits laitiers
- NF EN ISO 6579-1 (2017) - Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* - Partie 1 : recherche des *Salmonella* spp.
- EN ISO 22964 (2017) Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détection de *Cronobacter* spp.
- Afssa. (2008). Contamination microbienne des préparations lactées en poudres destinées aux nourissons et personnes âgées. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-PoudresLait.pdf>.
- Aviles, B., Klotz, C., Eifert, J., Williams, R., & Ponder, M. (2013). Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. *International Journal of Food Microbiology*, 162(3), 252-259. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.026>
- Barbau-Piednoir, E., Mahillon, J., Pillyser, J., Coucke, W., Roosens, N. H., & Botteldoorn, N. (2014). Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar Enteritidis. *Journal of microbiological methods*, 103, 131-137.
- Beuchat, L. R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R. P., Bourdichon, F., Fanning, S., . . . Ter Kuile, B. H. (2013). Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *Journal of food protection*, 76(1), 150-172.
- Caro, A., Got, P., Lesne, J., Binard, S., & Baleux, B. (1999). Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella* Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3229-3232.
- Eriksson De Rezende, C., Mallinson, E., Gupte, A., & Joseph, S. (2001). *Salmonella* spp. are affected by different levels of water activity in closed microcosms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 222-225.
- Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., & Andrews, S. (2013). Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN microbiology*, 2013.
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A., & Fanning, S. (2013). Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in microbiology*, 4, 331.
- Fittipaldi, M., Nocker, A., & Codony, F. (2012). Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of microbiological methods*, 91(2), 276-289. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.007>

- Gruzdev, N., Pinto, R., & Sela, S. (2012). Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. *Food microbiology*, 32(2), 415-422.
- Gupte, A., Eriksson De Rezende, C., & Joseph, S. (2003). Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6669-6675.
- Habraken, C., & Mossel, D. (1986). Management of *Salmonella* risks in the production of powdered milk products. *Netherlands milk and dairy journal*, 40, 99-116.
- Highmore, C., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S., & Keevil, C. (2018). Viable but nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Thompson induced by chlorine stress remain infectious. *mBio*.
- Hu, S., Yu, Y., & Xiao, X. (2017). Stress resistance, detection and disinfection of *Cronobacter* spp. in dairy products: A review. *Food Control*.
- Jameelah, M., Dewanti-Hariyadi, R., & Nurjanah, S. (2018). Expression of rpoS, ompA and hfq genes of *Cronobacter sakazakii* strain Yrt2a during stress and viable but nonculturable state. *Food Science and Biotechnology*, 1-6. doi:<https://doi.org/10.1007/s10068-018-0313-5>
- Jongenburger, I., Reij, M., Boer, E., Gorris, L., & Zwietering, M. (2011). Actual distribution of *Cronobacter* spp. in industrial batches of powdered infant formula and consequences for performance of sampling strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 62-69.
- Keer, J. T., & Birch, L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of microbiological methods*, 53(2), 175-183. doi:[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00025-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00025-3)
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *biometrics*, 159-174.
- Li, F., Xie, G., Zhou, B., Yu, P., Yu, S., Aguilar, Z. P., . . . Xu, H. (2016). Rapid and simultaneous detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* in infant food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 176-182.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 5, 258.
- Miled-Bennour, R., Guillier, L., Neves, S., Augustin, J.-C., Colin, P., & Besse, N. G. (2011). Individual cell lag time distributions of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) and impact of pooling samples on its detection in powdered infant formula. *Food microbiology*, 28(4), 648-655.
- Miled-Bennour, R., Neves, S., Baudouin, N., Lombard, B., Deperrois, V., Colin, P., & Besse, N. G. (2010). Impact of pooling powdered infant formula samples on bacterial evolution and *Cronobacter* detection. *International Journal of Food Microbiology*, 138(3), 250-259.
- Morishige, Y., Koike, A., Tamura-Ueyama, A., & Amano, F. (2017). Induction of Viable but Nonculturable *Salmonella* in exponentially grown cells by exposure to a low-humidity environment and their resuscitation by catalase. *Journal of food protection*, 80(2), 288-294.
- Nocker, A., Cheung, C. Y., & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 310-320. doi:S0167-7012(06)00125-4 [pii] 10.1016/j.mimet.2006.04.015
- Nogva, H. K., Drømtorp, S. M., Nissen, H., & Rudi, K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques*, 34, 804-813.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43(special issue), 93-100.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415-425. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x
- Pan, Y., & Breidt, F. (2007). Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(24), 8028-8031. doi:10.1128/aem.01198-07

- Purevdorj-Gage, L., Nixon, B., Bodine, K., Xu, Q., & Doerrler, W. T. (2018). Differential effect of food sanitizers on formation of Viable but Nonculturable *Salmonella enterica* in Poultry. *Journal of food protection*, 81(3), 386-393.
- Tomás Fornés, D., McMahon, W., Moulin, J., & Klijn, A. (2017). Validation of test portion pooling for *Salmonella* spp. detection in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 13-21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.005>
- Yang, Y., Wan, C., Xu, H., Lai, W., Xiong, Y., Xu, F., . . . Wei, H. (2012). Development of a multiplexed PCR assay combined with propidium monoazide treatment for rapid and accurate detection and identification of three viable *Salmonella enterica* serovars. *Food Control*, 28(2), 456-462. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.061>
- Zwietering, M. H., Jacxsens, L., Membré, J.-M., Nauta, M., & Peterz, M. (2016). Relevance of microbial finished product testing in food safety management. *Food Control*, 60, 31-43. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.002>

## ANNEXE 1 : PROGRAMME ANSES 2008.R

```
R_distri <- function(cas,semence=1234,
                    nbsmin=10000,nbsmax=100000,
                    nbcontrol=20,
                    prec=0.001,niveau=0.95)
{
#AIM computing the probability distribution of
# the number of positive microbiological
# analyses
#DESCRIPTION
# The computation is done by simulation
# for a given case.
# The contaminated part is supposed to be connex
# (details are given within the code)
# to optimize the number of simulation some confidence
# interval of the parameter can be done
# if nbmin == nbmax so no optimization is done
# else at regular interval of number of simulations
# the confidence interval for the probability
# of no positive analysis is computed and if
# it is less than the required precision,
# no more simulations are done.
#KEYWORDS probability
#REQUIRED ARGUMENTS
# cas: description of the case
# characterized by
# 1: C_mass (kg) masse of the batch
# 2: C_nbre (nest number per kg) for the complete batch
# 3: C_prop (-) contaminated proportion of the batch
# 4: P_nbre : number of elementary samples
# 5: P_mass (kg) : masse of each elementary sample
# 6: A_regr : number of elementary samples which are pooled
# 7: A_prop : proportion of analyzed powder from each pool
#
#OPTIONAL ARGUMENTS
# semence: value to first give to the pseudo-generator
# (if NULL it is not reset)
```



```
# nbsmin: minimum number of simulations to perform
# nbsmax: maximum number of simulations to perform
# nbcontrol: number of controls to perform to stop the simulations
# prec: required precision to stop the simulation at a control
# niveau: level to use for computing the confidence interval
#
#VALUE
# a vector comprising in that order
# + semence (0 is NULL)
# + the number of performed simulations
# + the obtained confidence interval
# + the probabilities for (0,1,...,nb_ana) positive analyses
#
#REFERENCE
# the report to be written within the working group
# "binom" package by Dorai-Raj (which must be loaded)
#SEE ALSO
#COMMENT
# BE CAREFUL there is an approximation in the computation:
# It is supposed that the proportion which is contaminated
# is much much bigger than the proportion of elementary
# samples (this seems acceptable in practical conditions
# but otherwise the result is false although the situation
# is possible).
#AUTHOR J.-B. Denis
#FIRST CREATED 07_01_16
#LAST MODIFIED 07_01_23
#

# some checks and initializations
if (!is.null(semence)) { set.seed(semence);}
else { semence <- 0;}
Cmass <- cas[1];
Cnbre <- cas[2];
Cprop <- cas[3];
Pnbre <- cas[4];
Pmass <- cas[5];
Aregr <- cas[6];
Aprop <- cas[7];
```

```
nbana <- round(Pnbre / Aregr);
if(nbana * Aregr != Pnbre) {stop("tombe pas juste!");};
resu <- rep(0, nbana+1);
nbnid <- round(Cmass * Cnbre);

# control strategy
nbcontrol <- min(max(0,nbcontrol), 1000);
if ((nbcontrol == 0) | (nbsmin==nbsmax)) { controls <- nbsmax;}
else { controls <- round(seq(nbsmin,nbsmax,length=nbcontrol));}

# Simulations
#
### generating the contamination departures within the batch
if ((Cprop <= 0) | (Cprop > 1)) {stop("C_prop pas propre!");}
departconta <- runif(nbsmax, 0, 1-Cprop);

### generating the samplings (giving the time of the first sample)
prelevement <- runif(nbsmax, 0, 1/Pnbre);

### not able to avoid the big loop
for (jbd in 1:nbsmax) {
  # times when the samples are done (systematic sampling)
  ou <- (prelevement[jbd]+(0:(Pnbre-1))/Pnbre);
  # samples belonging to the contaminated part
  quels <- (ou>departconta[jbd]) & (ou <= (departconta[jbd]+Cprop));
  # number of contaminated samples in each pool (size nbana)
  nbres <- apply(matrix(quels, Aregr), 2, sum);
  # results of the microbiological analyses
  positives <- 0;
  for (jd in 1:nbana) {
    # at least one sample belongs to the contaminated part
    if (nbres[jd] > 0) {
      # probability of detection of one contaminated nest is
      # the ratio between the contaminated powder and the analysed part
      pdetect <- (Aprop * nbres[jd] * Pmass) / (Cmass * Cprop);
      positives <- positives + (rbinom(1, nbnid, pdetect) > 0);
    }
  }
}
```

```
resu[positives+1] <- resu[positives+1] + 1;
fini <- FALSE;
if (sum(jbd == controls) > 0) {
  cal <- binom.confint(resu[1], jbd, me="exact", conf.level=niveau);
  prex <- as.numeric(cal["upper"]) - as.numeric(cal["lower"]);
  fini <- (prex <= prec);
}
if (fini) {break}
}
```

```
arron <- round(log10(prec^-1))+1;
if (jbd != sum(resu)) {
  cat("nbnid =",nbnid,"\n");
  cat("pdetect =",pdetect,"\n");
  cat("positives =",positives,"\n");
  cat("<<< *****",jbd,sum(resu),">>>\n");
  stop("pas bon dans R_distri !");
}
}
```