

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 4 février 2020

## **AVIS révisé<sup>1</sup>** **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

**relatif à la filière de production des préparations en poudre pour nourrissons**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.  
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.  
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.  
Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).  
Ses avis sont publiés sur son site internet.*

---

L'Anses a été saisie le 11 décembre 2018 par la Direction générale de l'Alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'appui relatif à la filière de production des préparations en poudre pour nourrissons.

---

### Sommaire

1.	Contexte et objet de la saisine .....	3
2.	Organisation de l'expertise .....	4
3.	Analyse et conclusions du CES BIORISK et du GT « Poudres infantiles » .....	5
3.1.	Préambule .....	5
3.2.	Application des principes HACCP aux préparations en poudre pour nourrissons .....	5
3.2.1.	Rappels .....	6
3.2.2.	Détail des étapes du plan HACCP .....	7
3.2.3.	Critères microbiologiques réglementaires .....	13
3.2.4.	Résumé des mesures de maîtrise .....	14
3.3.	Analyse des quatre PMS transmis par l'administration .....	15
3.3.1.	Points forts .....	16
3.3.2.	Points à approfondir .....	16
3.3.3.	Points faibles .....	17
3.4.	Apport et limites du contrôle microbiologique du produit fini .....	26
3.4.1.	Préambule .....	26
3.4.2.	Objectifs .....	26
3.4.3.	Construction du plan d'échantillonnage .....	27
3.4.4.	Calculs associés au plan d'échantillonnage du produit fini .....	32

---

<sup>1</sup> Annule et remplace l'avis du 19 septembre 2019. Les corrections effectuées sont décrites en Annexe 4.

3.4.5.	Exemple de plan d'échantillonnage du produit fini .....	33
3.4.6.	Bilan sur le plan d'échantillonnage du produit fini.....	35
3.5.	Prévention et surveillance de la contamination environnementale.....	35
3.5.1.	Objectifs et stratégie de mise en place .....	35
3.5.2.	Cartographie des voies de contamination d'un site de production et diagramme de causalité 37	
3.6.	Prélèvements et analyses : aspects techniques .....	46
3.6.1.	Techniques de prélèvement.....	46
3.6.2.	Méthodes analytiques .....	48
3.6.3.	Intérêt du recours à la caractérisation approfondie des souches .....	50
4.	Réponses aux questions posées .....	53
5.	Conclusions du CES BIORISK et du Groupe de travail.....	57
6.	Conclusions et recommandations de l'Agence .....	59
	Annexe 1 : Présentation des intervenants .....	66
	Annexe 2 : Définitions .....	69
	Annexe 3 : Réglementation sur les plans de maitrise sanitaire.....	72

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

À la suite de la détection, en décembre 2017, de salmonelles dans différents lots de préparations en poudre pour nourrissons, la Direction générale de l'alimentation (DGAL) a diligenté un plan de contrôle de tous les établissements français fabriquant, mélangeant ou conditionnant ces produits. Les informations recueillies à cette occasion montrent que les formulations et les procédés de fabrication de ces produits ont évolué au cours des dernières années.

L'Anses a été saisie pour réaliser une actualisation de l'expertise rendue par l'Afssa en 2008 (Contamination microbienne des préparations lactées en poudre destinées aux nourrissons et personnes âgées) (Afssa 2008), en particulier sur l'analyse des dangers et l'évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise mises en œuvre par les exploitants. L'avis de l'Anses servira de base à la rédaction d'une instruction technique qui détaillera les points de vigilance à examiner lors des inspections.

En appui de la saisine, quatre plans de maîtrise sanitaire (PMS) représentatifs de la diversité des procédés de fabrication et des productions ont été transmis par la DGAL.

En accord avec les administrations de tutelles, les questions instruites sont les suivantes :

### **Analyse des dangers du procédé**

1. Quels sont les principaux dangers microbiologiques associés aux préparations en poudre pour nourrissons au sens du règlement (UE) n°609/2013, et cela quels que soient leurs ingrédients principaux (lait, riz, lécithine de soja, ...) ?
2. À la lecture des quatre plans de maîtrise sanitaire adressés, quelles sont les principales mesures de maîtrise des dangers identifiés à la question 1 (bonnes pratiques d'hygiène, points de vigilance, programmes prérequis opérationnels, mesures associées aux points critiques, etc.) ? Quelles sont les conditions de leur efficacité ?
3. Les dossiers joints illustrent la diversité des procédés et des stratégies des entreprises. Quelle(s) évolution(s) des procédés de fabrication et des pratiques (p. ex. augmentation du débit de séchage, modification des formulations, p. ex. réduction de la fréquence des nettoyages, réduction du nombre de prélèvements soumis à analyses) devraient conduire à reconsidérer l'efficacité des mesures de maîtrise identifiées précédemment ? Ce bilan sera effectué sur la base des quatre PMS et des auditions réalisées sans viser l'exhaustivité.

### **Évaluation des stratégies d'autocontrôles**

4. Le rapport de l'Afssa de 2008 insiste sur « la nécessité de surveiller avec rigueur l'hygiène de l'environnement de fabrication ». Comment concevoir un plan de contrôle de l'environnement efficace ? Comment apprécier l'efficacité d'un plan de contrôle de l'environnement préexistant ?
5. En cas de contamination récurrente de l'environnement au-delà d'un seuil prédéfini, quelles mesures de contrôle renforcées et quelles mesures correctives faut-il appliquer ? Comment valider l'efficacité de ces mesures ? Est-il possible d'apprécier l'impact de la durée de cette phase sur la fiabilité de la validation ?
6. Parmi l'ensemble des mesures de contrôle de l'efficacité du nettoyage, comment apprécier l'intérêt des inspections visuelles, tant sur la propreté des locaux à l'issue du nettoyage que dans l'appréciation du séchage après un lavage à l'eau ? Comment les articuler avec les autres formes de vérification ?
7. En complément des éléments relatifs aux indicateurs d'hygiène des procédés dans le rapport de 2008 susvisé, est-il possible d'établir un lien de probabilité entre une contamination récurrente dans l'environnement et une contamination des produits ?
8. En annexe de votre réponse à la saisine relative au plan d'échantillonnage proposé par Lactalis, figurait un programme utilisable avec le logiciel R pour évaluer la performance d'un tel plan. Or, l'utilisation de ce logiciel demande un niveau d'expertise significatif. Pourriez-vous remplir le tableau annexé pour guider les inspecteurs lors de la gestion des non-conformités dans les produits ?

### **Plan de surveillance des poudres produites en France**

9. La production française de lait en poudre infantile a été d'environ 145 000 tonnes en 2016. Combien d'échantillons seraient nécessaires pour être capable de détecter un taux de contamination plus faible d'un facteur 10 que celui couramment observé pour d'autres denrées, soit un taux de contamination de 1 pour 1 000 lots de 5 à 100 tonnes ? Même question si on estime le taux de contamination à 1 pour 10 000 lots ?
10. Le règlement (CE) n° 2073/2005 impose d'analyser 30 échantillons de 25 g par lot. Quelle serait la différence de performance entre des plans consistant à prélever :
- 25 g dans 30 boîtes différentes d'un même lot ;
  - 6 x 25 g soit 150 g dans 5 boîtes d'un même lot ;
  - 30 x 25 g soit 750 g dans une seule boîte du lot ?

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

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'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (CES BIORISK). L'Anses a confié au groupe de travail « Poudres infantiles » l'instruction de cette saisine, créé par décision du 20 février 2019.

Les travaux ont été présentés au CES BIORISK tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 17 avril 2019 et 9 juillet 2019, ainsi qu'au groupe de travail pérenne « Évaluation des guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP » (GT GBPH). Les travaux ont été adoptés par le CES BIORISK le 9 juillet 2019.

L'expertise du groupe de travail s'est appuyée sur la littérature scientifique et des ouvrages techniques (cf. références bibliographiques) portant notamment sur :

- la maîtrise des procédés de production de préparations en poudre pour nourrissons ;
- les dangers biologiques associés aux préparations en poudre pour nourrissons (en particulier *Salmonella* et *Cronobacter*) ;
- la prévention de la contamination environnementale dans les ateliers de production d'aliments à faible activité de l'eau ;
- l'échantillonnage des préparations en poudre pour nourrissons.

En appui à la saisine, quatre plans de maîtrise sanitaire (PMS) ont été transmis par la DGAL. Ces quatre PMS ont été analysés dans l'objectif de déterminer s'ils apportent toutes les informations relatives au respect des exigences sanitaires. Des informations complémentaires (réponses écrites à un questionnaire) ont été fournies par deux des industriels dont les PMS ont été étudiés. Par ailleurs, des représentants de la DGAL et des inspecteurs vétérinaires ont été auditionnés sur le déroulement d'une inspection de ce type d'établissement.

Concernant les aspects relatifs aux auto-contrôles du produit fini, le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) a été interrogé sur les pratiques de la filière en matière d'échantillonnage des préparations en poudre pour nourrissons (hypothèses et méthodes de calcul de l'efficacité de l'échantillonnage).

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et 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. Dans ce contexte, un expert du CES BIORISK n'a pas pris part aux délibérations sur cette saisine, il a été auditionné par le groupe de travail. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES BIORISK ET DU GT « POUDRES INFANTILES »

#### 3.1. Préambule

Les épidémies récentes liées à la consommation des préparations en poudre pour nourrissons ont montré que les analyses microbiologiques sur les produits finis étaient insuffisantes pour maîtriser le risque et qu'il est nécessaire notamment :

- de maîtriser rigoureusement les conditions de production de ces produits par le respect des bonnes pratiques d'hygiène et la mise en place d'une démarche HACCP adaptée à leurs conditions de fabrication, de conditionnement et de stockage ;
- de respecter les mesures d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons.

En effet, la plupart du temps, les produits mis sur le marché et impliqués dans les épidémies ont été considérés comme conformes sur le plan des dangers microbiologiques après la réalisation des analyses libératoires réglementaires. Cependant, il a été possible de retrouver les bactéries pathogènes dans l'environnement des sites de production de ces produits impliqués dans les épidémies, quelquefois même après plusieurs années.

Dans ce contexte, les services de contrôle s'interrogent sur les possibilités d'amélioration des pratiques de contrôle officiel et d'autocontrôle mises en œuvre pour prévenir les épidémies et ont saisi l'Anses sur des questions pratiques pour maîtriser les dangers microbiologiques.

Dans ce but, le groupe de travail a considéré comme nécessaire dans un premier temps de rappeler de façon pratique les éléments essentiels de vocabulaire et de mise en œuvre des bonnes pratiques et de la démarche HACCP pour les préparations en poudre pour nourrissons (section 3.2).

Le groupe de travail a ensuite déterminé dans les PMS fournis par l'administration si les mesures de maîtrise étaient validées, appliquées, surveillées, vérifiées et correctement documentées notamment sur les points recommandés par le rapport de l'Afssa de 2008, l'objectif étant d'identifier des axes de progrès et des attendus précis tant pour les industriels que pour les inspecteurs (section 3.3).

Pour mieux caractériser les limites du contrôle microbiologique des produits finis, il a fallu étudier les modalités de contamination des produits au cours des fabrications et en déduire les conséquences en matière de lot contaminé et de performance de différents plans d'échantillonnage utilisés pour détecter la non-conformité des lots avant commercialisation (section 3.4).

Pour rappeler l'intérêt majeur de la maîtrise de la contamination environnementale en regard du seul contrôle des produits finis, la surveillance de l'environnement, la caractérisation précise des sources et voies de contamination et la nécessité d'une sectorisation des activités à niveau d'hygiène défini sont traitées dans un chapitre dédié (section 3.5).

Enfin, des considérations techniques présentent, en section 3.6, les limites de performance des analyses sur les produits finis et l'environnement et rappellent l'intérêt des techniques de caractérisation moléculaire des flores environnementales et alimentaires.

#### 3.2. Application des principes HACCP aux préparations en poudre pour nourrissons

Après un rappel de la logique de la démarche HACCP, quelques étapes d'élaboration d'un plan HACCP pour la fabrication de préparations en poudre pour nourrissons sont exposées de façon plus détaillée. Les mesures générales de maîtrise (PRP) et les mesures de maîtrise spécifiques associées à des points critiques pour la maîtrise (CCP) sont décrites ensemble.

Les définitions utilisées dans ce document ont été rédigées par le groupe de travail. Elles tiennent compte des évolutions en cours pour la révision des Principes généraux d'hygiène des aliments du Comité *du Codex alimentarius* pour l'hygiène des aliments (CCFH). Les définitions sont regroupées en annexe 2.

### 3.2.1. Rappels

Certains **programmes prérequis** (PRP) dont font partie les **bonnes pratiques d'hygiène**, par exemple la réfrigération, permettent d'améliorer la salubrité des aliments. En outre, ils améliorent la sécurité en maîtrisant un ou des dangers. Les PRP sont donc des mesures générales de maîtrise.

Toutefois, certains **dangers**, non maîtrisés par les PRP, peuvent être identifiés comme **significatifs** lors de **l'analyse des dangers** parce que leur maîtrise est jugée essentielle pour la sécurité de l'aliment. De ce fait, ils nécessitent des **mesures de maîtrise spécifiques**. Ces dernières sont donc des actions qui seules ou en combinaison permettent de maîtriser les dangers significatifs, identifiés et évalués par l'analyse des dangers, et non maîtrisés par les PRP. Un exemple de mesure de maîtrise spécifique de *Listeria monocytogenes* qui combine plusieurs actions est l'obtention simultanée d'un  $pH \leq 5,0$  et d'une  $a_w \leq 0,94$ .

Conformément à la définition qu'en donne le *Codex alimentarius* depuis 1993, une étape de production où est appliquée une mesure de maîtrise essentielle est nommée « **point critique pour la maîtrise** », abrégé en CCP (*critical control point*) : est critique ce qui est essentiel. On désigne souvent à tort ces mesures de maîtrise essentielles appliquées aux CCP (étapes) comme des CCP (mesures de maîtrise).

Chaque **mesure de maîtrise** appliquée à un CCP doit posséder une **limite critique** validée qui distingue l'acceptabilité de la non-acceptabilité. Une température plancher pour la pasteurisation, une durée de traitement (physique ou chimique), l'observation d'une action, sont des exemples de limites critiques. Il est possible d'être plus exigeant et de fixer des niveaux cibles, c'est-à-dire des valeurs du critère où le produit n'est pas encore inacceptable mais qui nécessitent de mener des actions pour revenir immédiatement au niveau de maîtrise fixé.

Pour chaque CCP, lorsque les mesures de maîtrise spécifiques sont **surveillées** de façon continue (p. ex. débit, température ou pression) et que leur limite critique n'est pas respectée, l'aliment est automatiquement géré comme potentiellement préjudiciable à la santé.

Lorsque la mesure de maîtrise spécifique ne peut pas être surveillée en continu, et/ou qu'elle peut seulement être surveillée au moyen d'une observation (p.ex. couverture complète du poisson par de la glace), la mesure de maîtrise spécifique est désignée sous le nom de **programme prérequis opérationnel (PRPO)** par la norme NF EN ISO 22000:2018. La perte de maîtrise d'un PRPO oblige le responsable à déterminer quel lot ou partie de lot est susceptible ou non d'être préjudiciable à la santé.

Les mesures de maîtrise spécifiques ne sont pas forcément mises en œuvre à l'étape où le danger survient mais peuvent l'être à une étape ultérieure. Par exemple, la pasteurisation du lait en usine permet de maîtriser des dangers apportés au cours de la traite, du stockage ou du transport du lait.

Les mesures de maîtrise doivent être obligatoirement **validées**, c'est-à-dire que l'industriel doit obtenir des preuves que, seules ou en combinaison, elles sont efficaces pour éviter, réduire à un niveau acceptable ou supprimer le ou les dangers identifiés. La validation intervient *a priori*, c'est-à-dire avant sa mise en œuvre effective pour obtenir le niveau de maîtrise acceptable défini pour le produit.

La validation de ces mesures de maîtrise peut s'effectuer par divers moyens, seuls ou associés :

- utilisation de données scientifiques ou techniques : les mesures de maîtrise décrites dans les guides de bonnes pratiques d'hygiène n'ont normalement pas besoin d'être revalidées ;
- études antérieures de validation (sous réserve que le « nouveau » produit soit fabriqué de la même manière que l'« ancien ») ;
- tests expérimentaux en laboratoire (p. ex. tests de croissance, tests de vieillissement) et modélisation mathématique (p. ex. microbiologie prévisionnelle, appréciation quantitative du risque) ;
- utilisation des données obtenues au cours des productions (p. ex. autocontrôles, analyses) en veillant à la représentativité et à la qualité de l'échantillonnage.

Les mesures de maîtrise nécessitent d'être revalidées, notamment en cas :

- d'identification d'écart par les activités de surveillance ou de vérification ;
- de changement de la formulation du produit ;
- de changement des paramètres de la mesure de maîtrise (p. ex. barème temps-température, volume produit) ;
- de changement réglementaire, de la découverte d'un nouveau danger, de l'adaptation du danger à la mesure de maîtrise, etc.

Le dépassement des limites critiques impose des **actions correctives**. Celles qui concernent le produit sont souvent faciles à déterminer à l'avance, ce qui est moins le cas de celles qui concernent le procédé, car ces dernières dépendent d'une analyse fine des causes.

Pour prouver qu'elles sont mises en œuvre correctement, l'efficacité sur le produit fini de ces limites fixées à l'avance et surveillées pendant la production doit être vérifiée *a posteriori*. Il s'agit essentiellement d'une **vérification** de la conformité du produit (p. ex. au moyen d'analyses) ou de la vérification de l'efficacité du système (p. ex. audits, **contrôles** d'hygiène, réclamations client). Dans le présent texte, le mot « contrôle » concerne uniquement les analyses microbiologiques des ingrédients, du produit fini ou de l'environnement de fabrication, pour détecter les contaminants microbiologiques, ou déterminer leur nature et/ou leur niveau.

Les mesures de maîtrise spécifiques des dangers doivent être documentées par des procédures, instructions et enregistrements : ces derniers font partie du **plan de maîtrise sanitaire**.

### 3.2.2. Détail des étapes du plan HACCP

Ce qui suit est une illustration de la démarche HACCP appliquée à la production de préparations en poudre pour nourrissons, en la limitant aux dangers microbiologiques. Il n'est en effet pas possible de détailler les étapes de l'HACCP de façon plus précise dans un document générique sans s'adosser à une usine spécifique.

#### ▪ Étape 1 – Constituer l'équipe HACCP et identifier l'objet de l'étude

Citée ici pour mémoire, mais non développée.

#### ▪ Étape 2 – Description du produit

**Une préparation pour nourrissons** est une denrée alimentaire destinée à être utilisée par des nourrissons (enfants de moins de douze mois) pendant les premiers mois de leur vie et qui répond à elle seule aux besoins nutritionnels de ces nourrissons jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée (Règlement (UE) n° 609/2013). En outre, ils doivent dans certains cas ne pas contenir d'allergènes, et/ou comporter des additifs tels que des vitamines ou des acides gras essentiels.

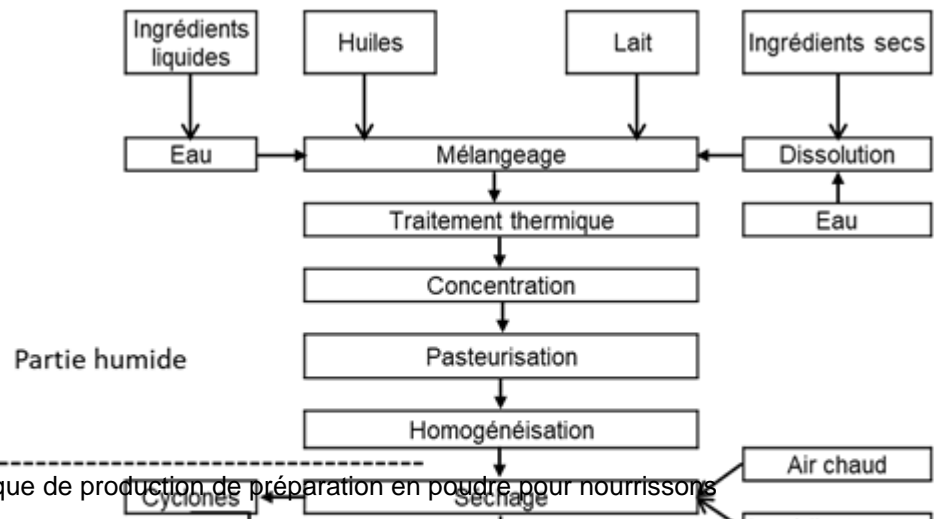
La composition des préparations en poudre pour nourrissons a évolué au cours de la décennie écoulée : formulations plus nombreuses incorporant davantage d'ingrédients, p. ex. prébiotiques, probiotiques, vitamines, corps gras, peptides bioactifs, acides organiques (Kent *et al.* 2015). Ceci a incité les industriels à revoir leur analyse des dangers.

#### ▪ Étape 3 – Description de l'utilisation attendue et du consommateur final

Du fait de l'élimination de l'eau, les préparations en poudre pour nourrissons sont faciles à transporter et peuvent être entreposées à température ambiante. Les préparations en poudre pour nourrissons sont destinées à être reconstituées c'est-à-dire additionnées d'eau « destinée à la consommation humaine » (eau du robinet, eau de source ou eau minérale naturelle convenant aux nourrissons) (Afssa 2005). Quand la consommation n'est pas faite rapidement après la reconstitution ou que le produit reconstitué n'est pas conservé au froid, la croissance de bactéries pathogènes (si le produit en contient) peut être à l'origine de troubles de santé d'autant plus graves que les nourrissons sont plus fragiles (p.ex. prématurés) (FAO/WHO 2004, 2006, 2007, 2008).

#### ▪ Étape 4 – Description du procédé

Le diagramme ci-dessous résume de façon simplifiée les étapes de la fabrication des préparations en poudre pour nourrissons, telles qu'elles sont discutées dans le présent rapport et qui comportent un mélange d'ingrédients sous forme d'un liquide soumis à une pasteurisation, un séchage, et l'ajout d'ingrédients avant conditionnement. Certains ateliers se limitent à un mélange d'ingrédients avant pasteurisation éventuellement suivie d'ajout d'ingrédients thermosensibles, avant séchage. Certains ateliers font seulement le mélange de produit secs. Il existe un procédé de séchage qui n'utilise pas l'air chaud mais des rouleaux chaud (procédé Hamaker). Ce procédé n'étant pas, à la connaissance des experts, utilisé en France, il n'en sera donc pas question ici, pas plus que l'emploi de filtres textiles pour le captage des plus petites particules aéroportées, nommées fines, qui est un **point d'accumulation** de *Cronobacter* spp. selon Jacobs, Braun, et Hammer (2011).



**Figure 1.** Diagramme générique de production de préparation en poudre pour nourrissons

La fabrication comporte de nombreuses étapes. Du lait, éventuellement complété par du lactosérum, est additionné d'une solution aqueuse d'ingrédients divers (p.ex. farines végétales, protéines, vitamines, enzymes, minéraux). Le mélange est concentré dans un évaporateur pour commencer à réduire la quantité d'eau avant la déshydratation finale. D'autres ingrédients peuvent être ajoutés après concentration. Le produit concentré est pasteurisé, c'est-à-dire traité thermiquement pour inactiver la majorité de la charge microbienne, notamment les bactéries pathogènes non sporulées. Le produit pasteurisé est homogénéisé : on le fait s'écouler sous pression entre deux parois proches, de façon à réduire la taille des éléments insolubles tels que les globules gras. Ces opérations sont réalisées dans la partie humide de l'usine.

Dans la partie sèche, le mélange concentré - qui a été pasteurisé et homogénéisé - est injecté au sommet d'une tour de séchage où il est pulvérisé sous forme de gouttelettes dans de l'air généralement stérilisé par filtration et chauffé à des températures élevées, de 150 °C à 400 °C. Sous l'effet de la chaleur, l'eau de chaque gouttelette s'évapore, et ce sont des particules de matières sèches qui tombent au bas de la tour de séchage. Il convient de noter que : a) l'évaporation a pour effet que la température au sein de la gouttelette reste inférieure à celle de l'air ; b) la diminution de la teneur en eau rend les bactéries résistantes à la chaleur ; c) le temps de séjour dans l'air chaud est court. Le séchage à l'air chaud affecte donc peu la viabilité des bactéries : ainsi, le procédé peut être utilisé pour la déshydratation de levains lactiques (Peighambardoust, Golshan Tafti, et Hesari 2011). Les particules les plus lourdes tombent par l'orifice inférieur de la tour et passent sur un lit fluidisé où elles flottent en avançant dans un courant ascendant d'air chaud qui assure la finition du séchage. L'air sorti de la tour en emportant les fines (les plus petites particules) passe dans un ou plusieurs cyclones. Ce sont des cylindres dans lesquels l'air tourbillonne de sorte que les particules sont propulsées par la force centrifuge vers les parois verticales, puis tombent et sont envoyées au début du lit fluidisé. La poudre est éventuellement additionnée d'ingrédients secs ou humides destinés p.ex. à faciliter sa remise en solution. Avant d'être conditionnée pour la vente au détail, ou expédiée dans d'autres usines, la poudre peut être entreposée dans des conteneurs de grand volume. Les opérations de conditionnement ne se font pas en conditions aseptiques. Toutefois, certains ateliers effectuent le conditionnement dans les salles à concentration particulière maîtrisée.

Là où la poudre est en contact avec l'air ambiant, des particules fines emportées par le moindre mouvement de l'air finissent par s'accumuler de façon visible et encrasser tous les endroits exposés à l'air libre de la partie sèche, les surfaces horizontales comme verticales.

▪ **Étape 5 – Confirmer sur place le diagramme de fabrication**

Pour mémoire.

▪ **Étape 6 et principe 1 – Lister les dangers susceptibles de survenir, les analyser et identifier ceux qui sont significatifs, examiner les mesures de maîtrise de ces derniers**

**La pasteurisation qui précède le séchage est un CCP dont la validation n'est pas à refaire (FAO/OMS 2009) et dont les procédures de surveillance et de vérification sont bien connues.** Une fréquence de nettoyage insuffisante de l'évaporateur ou du pasteurisateur lui-même peut conduire à la formation de



biofilms, notamment dans la section de refroidissement au sein du pasteurisateur. Toutefois, à la connaissance des experts, la survie de bactéries pathogènes non sporulées n'a pas été observée jusqu'ici. **Dans ce qui suit, seules les zones entourant la tour de séchage et le conditionnement sont étudiées.**

Le produit qui entre dans la tour de séchage n'est pas stérile. Une fois sortie des cyclones, la poudre est en contact avec des équipements et l'air ambiant qui ne sont pas stériles. En effet, des opérateurs circulent dans la partie sèche, notamment ceux qui surveillent l'entreposage intermédiaire et le conditionnement. En outre, il est difficile de réduire à zéro la présence d'animaux nuisibles (insectes, oiseaux, rongeurs). Les conteneurs d'entreposage ne sont pas stériles. Enfin, la répartition de la poudre dans les contenants destinés à la vente ne se fait pas en condition aseptique.

Dans le cas où tous les ingrédients sont combinés préalablement à la pasteurisation et à l'entrée dans la tour de séchage, la contamination du produit fini par des bactéries indésirables provient essentiellement de l'environnement de fabrication. Lorsque des ingrédients sont ajoutés après le séchage, les micro-organismes indésirables qu'ils apportent s'ajoutent à ceux qui proviennent de l'environnement de fabrication. Certains ingrédients ajoutés après séchage sont humides et introduisent donc de l'humidité dans la partie de l'usine qui devrait rester sèche.

De la poudre peut coller aux parois internes des équipements et s'y accumuler : pour éviter cela, des marteaux automatiques frappent régulièrement les parois des tours de séchage pour en décrocher les dépôts. La poudre peut aussi s'accumuler dans les recoins des équipements anciens, encore nombreux, qui n'ont pas été construits dans le respect des règles de la conception hygiénique (EHEDG 2005, 2014, OPX 2014). Dans ce cas, les amas de poudres subsistants malgré le nettoyage par des solutions détergentes peuvent rester humides après ce dernier, ce qui permet la multiplication de bactéries indésirables.

- Lister tous les dangers potentiels

L'analyse des dangers (1<sup>er</sup> principe du HACCP) est le processus consistant à réunir et à évaluer les informations sur les dangers identifiés dans l'environnement, dans le procédé ou dans l'aliment, et sur les conditions qui conduisent à leur présence, afin de décider si certains sont significatifs. Il s'agit donc :

- d'identifier les dangers qui sont raisonnablement prévisibles en fonction des caractéristiques du produit et des procédés mis en œuvre. Cette activité (identification des dangers) permet de dresser la liste longue des dangers potentiels ;
- de retenir ceux dont la maîtrise est essentielle pour la sécurité sanitaire des aliments. Cette activité (évaluation des dangers) permet de dresser la liste courte des dangers significatifs qui nécessitent des mesures de maîtrise spécifiques qu'il est essentiel de mettre en place.

Les préparations en poudre pour nourrissons sont susceptibles de contenir des micro-organismes pathogènes apportés par la matière première principale, le lait quand ils en contiennent, et aussi les autres ingrédients. Ces derniers sont extrêmement nombreux compte tenu de l'augmentation du nombre de formulations élaborées par les industriels et disponibles dans le commerce. Il n'est pas possible de lister dans cet avis l'intégralité des dangers potentiels apportés par les ingrédients autres que le lait, sans disposer de données précises sur les formulations et des diagrammes de fabrication.

Les principaux dangers associés au lait et aux produits laitiers sont les suivants (EFSA BIOHAZ Panel 2015, van Asselt *et al.* 2017) :

- *Salmonella* spp. ;
- *Cronobacter* ;
- *Brucella* spp. ;
- *Campylobacter* spp. ;
- *E. coli* STEC et autres *E. coli* potentiellement pathogènes ;
- *Listeria monocytogenes* ;
- *Mycobacterium bovis* et *tuberculosis* ;
- *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques ;
- *Bacillus cereus*.

Les bactéries pathogènes non sporulées apportées par les matières premières, l'environnement et le personnel avant une pasteurisation ou une étape de stérilisation sont éliminées par cette mesure de maîtrise essentielle.

Certaines bactéries sporulées (p. ex. *Bacillus spp.*) peuvent survivre à l'étape de pasteurisation. Cependant, les conditions de germination des spores ne sont pas toujours réunies et la production de toxines dans un aliment à  $a_w$  faible n'est pas possible.

Dans certains procédés des ingrédients sont rajoutés après la pasteurisation, avant ou après le séchage. Au regard des nombreuses formulations et de la variété de ces ingrédients, il est impossible d'établir dans ce document la liste longue des dangers potentiels post-pasteurisation. Toutefois, les dangers significatifs identifiés avant l'étape de pasteurisation peuvent être apportés après la pasteurisation par le biais de l'environnement, du personnel et des ingrédients.

La question des dangers potentiels a fait l'objet de plusieurs travaux de la FAO et de l'OMS. Comme le rappelle Forsythe (2018), les bactéries pathogènes ont été classées en trois groupes en fonction du degré de certitude de leur responsabilité dans les maladies d'origine alimentaire causées par les préparations en poudre pour nourrissons, lors de deux consultations FAO/OMS (FAO/WHO 2004, 2006) :

- responsabilité peu plausible ou pas encore démontrée : *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, et *Bacillus cereus*. Il est à noter que les souches de *B. cereus* détectées en Chine dans des préparations en poudre se sont révélées peu virulentes (Hwang et Park 2015) ;
- responsabilité plausible mais non démontrée : *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Klebsiella oxytoca* ; non-*Enterobacteriaceae* : *Acinetobacter spp.* ;
- responsabilité démontrée : *Salmonella* et *Cronobacter spp.* (Nazarowec-White et Farber 1997, Muytjens, Roelofs-Willemse, et Jaspar 1988, Iversen et Forsythe 2004, Iversen, Lane, et Forsythe 2004, FAO/WHO 2004, 2006, 2007, 2008).

De 2008 à 2019, 13 alertes liées à des dangers biologiques (cinq liées à *Salmonella* ; cinq liées à *Cronobacter* ; une liée à *Staphylococcus*, une liée à un champignon, une à « des bactéries ») dans les préparations en poudre pour nourrissons ont été émises par le Système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (RASFF 2019). Le tableau 1, qui liste des épidémies récentes associées aux préparations en poudre, ne fait apparaître que *Salmonella* et *Cronobacter spp.*

**Tableau 1.** Épidémies d'origine microbienne liées aux préparations infantiles en poudre déclarées entre 2008 et 2019.

Année	Pays	Matrice	Dangers	Cas	Sources
2008	France	Aliment en poudre pour nourrissons	<i>Salmonella</i> Give	57 cas	Jourdan <i>et al.</i> (2008) ; InVS (2009)
2008	Espagne	Aliment en poudre	<i>Salmonella</i> Kedougou	31 cas de moins de 12 mois et 10 enfants de plus 12 mois	Rodríguez-Urrego <i>et al.</i> (2010)
2010	Mexique	Aliment en poudre pour nourrissons reconstitué	<i>Cronobacter</i>	2 cas	Fouladkhah (2019)
2011	USA	Aliment en poudre pour nourrissons reconstitué	<i>Cronobacter</i>	4 cas	
2017	France	Préparations en poudre pour nourrissons	<i>Salmonella</i> Agona	39 cas	Jourdan-da-Silva <i>et al.</i> (2018)
2018-2019	France	Aliment en poudre à base de riz (production en Espagne)	<i>Salmonella</i> Poona	31 cas de 2 à 28 mois	Jones <i>et al.</i> (2019)

*Salmonella* est capable de survivre à l'état sec dans les préparations en poudre pendant plusieurs années (Finn *et al.* 2013, Podolak *et al.* 2010). Il en est de même pour *Cronobacter spp.* (Barron et Forsythe 2007, Edelson-Mammel, Porteous, et Buchanan 2005, Nazarowec-White et Farber 1997). En outre, si *Cronobacter* forme un biofilm dans un point d'accumulation humide, il devient très résistant au nettoyage et à la désinfection (Kim, Ryu, et Beuchat 2007).

Quelques dizaines de cellules de *Salmonella* suffisent à provoquer des troubles gastro-intestinaux chez la moitié des consommateurs exposés (Teunis *et al.* 2010), de sorte que le produit reconstitué peut être immédiatement préjudiciable à la santé en cas de contamination : les nourrissons affectés peuvent subir une déshydratation aux conséquences graves. Dans le cas de *Cronobacter* spp., c'est la conservation du produit à température ambiante après sa reconstitution, permettant la multiplication de *Cronobacter* spp., qui est à l'origine de troubles souvent létaux chez les nourrissons fragiles, notamment les prématurés (AFSSA 2005).

○ Identifier les dangers significatifs

Bien que le Règlement (CE) n°2073/2005 modifié prévoit un critère microbiologique de sécurité des aliments pour *L. monocytogenes*, l'absence de conséquences sanitaires connues liées à cette bactérie dans les préparations en poudre pour nourrissons (Podolak 2017) incite à ne pas la faire figurer dans la liste des dangers significatifs. Ce sont donc *Salmonella* et *Cronobacter* spp., agents pathogènes dont la responsabilité dans des maladies liées à la consommation de préparations en poudre est démontrée et dont la persistance dans l'environnement de fabrication et dans le produit est particulièrement longue, qui sont considérés comme significatifs. Cette liste devrait être complétée en cas d'épidémies causées par de nouveaux dangers et/ou si de nouveaux ingrédients sont susceptibles d'apporter des dangers actuellement considérés comme non significatifs.

○ Examiner les mesures de maîtrise des dangers significatifs

Les principales sources de ces micro-organismes dans les produits finis proviennent de la contamination après le traitement thermique de pasteurisation. Cette contamination provient d'une part, de l'ajout d'ingrédients contaminés, et d'autre part, des environnements et lignes de traitement (incluant le personnel) (Cordier 2008, March 2011).

Afin d'éviter le transfert vers la partie sèche de l'usine des dangers microbiologiques qui prévalent là où l'humidité favorise leur croissance, il devrait exister une séparation effective entre la partie humide et la partie sèche. Pour tenir compte des exigences d'hygiène particulières de chaque étape de la fabrication, les usines devraient être subdivisées en zones ; celles-ci sont définies dans le présent rapport comme suit :

- zone 1 (souvent dite de très haute hygiène) : zones où les produits sont manipulés et exposés à l'environnement de production sans étape ultérieure de traitement thermique / réduction du danger (p.ex. zone sèche) ;
- zone 2 (souvent dite de haute hygiène) : zones où les produits peuvent être ponctuellement exposés à l'environnement de production avec une étape ultérieure de traitement thermique / réduction de danger (p.ex. mélangeage des ingrédients) ;
- zone 3 (souvent dite d'hygiène intermédiaire) : zones en contact avec l'extérieur, où les produits sont protégés et manipulés sans être exposés à l'environnement de production (p.ex. salle d'expédition) ;
- zone 4 (d'hygiène de base) : quais de déchargement des matières premières, vestiaires du personnel, cafétéria, extérieur des bâtiments.

Les mesures d'hygiène spécifiques définies pour chaque zone doivent être toujours appliquées avec la même rigueur. À l'intérieur des zones, les précautions à prendre et les BPH ou les mesures de maîtrise dépendent de la proximité des surfaces avec le produit. On distingue :

- les surfaces en contact avec le produit (p.ex. parois internes des équipements, tapis convoyeurs, intérieur des contenants) ;
- les surfaces proches mais sans contact (p. ex. parois externes des équipements, supports des équipements, tenues des opérateurs) ;
- les surfaces éloignées (p. ex. murs, sols, caniveaux, plafonds, chariots).

Aucun traitement du produit fini pour y détruire les micro-organismes pathogènes n'est actuellement pratiqué pour des raisons de coût et/ou d'effets organoleptiques et nutritionnels indésirables (Kent *et al.* 2015). Les mesures de maîtrise devraient porter sur :

- les spécifications microbiologiques des ingrédients ajoutés après le séchage ;
- la prévention des transferts de contaminants microbiologiques de la poudre vers l'environnement des équipements et réciproquement, (« contamination croisée »). Ceci s'obtient avec des équipements

étanches ou par la maîtrise des mouvements d'air dans l'environnement des équipements ouverts, en particulier par le maintien d'une surpression de l'air de la zone de très haute hygiène ;

- le nettoyage de l'environnement des équipements en portant une attention particulière aux points d'accumulation, en prohibant l'emploi de l'eau. De ce fait, il ne peut y avoir de désinfection. Le nettoyage sans eau s'obtient p. ex. par l'emploi de balais et balayettes, grattoirs et aspirateurs (mais pas par l'emploi de soufflettes) ;
- le nettoyage, la désinfection et le séchage de l'intérieur des équipements, en portant une attention particulière à leur efficacité aux points d'accumulation potentiels, c'est-à-dire ceux où peuvent subsister des résidus organiques et de l'humidité après nettoyage. Cela implique une étude détaillée des matériaux auxquels la poudre peut adhérer et des défauts de conception hygiénique et le suivi de leur évolution au cours du temps (p.ex. surveillance de l'absence de fissure de la paroi interne de la tour de séchage).

▪ **Étape 7 et principe 2 – Déterminer les CCP**

**En dehors du CCP associé à la pasteurisation, il n'existe pas d'autre CCP concernant les dangers microbiologiques. Les mesures de maîtrise sont des PRP qui méritent une attention particulière et devraient être validées, vérifiées et surveillées. En effet l'innocuité du produit fini repose essentiellement sur ces PRP, sachant que la détection des non-conformités du produit fini ne peut pas être assurée par le contrôle de ce dernier (section 3.4).**

Les PRP, disponibles dans le présent contexte, ne peuvent être surveillées ni de façon automatique ni de façon continue. Leur surveillance consiste à observer si leur mise en œuvre est réelle. Dans le cas particulier d'un nettoyage humide de l'intérieur des équipements, la concentration, la température et la durée d'application des solutions chimiques de nettoyage en place (qui auront été validées au préalable) peuvent être surveillées de façon automatique en continu.

Pour le nettoyage à sec, il est difficile de mesurer l'efficacité des PRP vis-à-vis des dangers significatifs, car la détection de ces derniers est peu fréquente. L'indicateur d'hygiène recommandé pour la surveillance de l'hygiène de l'environnement de fabrication est l'ensemble des bactéries regroupées sous le nom d'*Enterobacteriaceae* (EFSA 2007, Buchanan et Oni 2012). Afin d'établir un niveau de contamination de référence (considéré conforme), il est suggéré de suivre très régulièrement la contamination des surfaces lorsqu'il est considéré de façon responsable que l'usine fonctionne dans les conditions hygiéniques optimales. Il convient de déterminer les points à surveiller en priorité, mais de ne pas négliger de surveiller de façon aléatoire d'autres points (cf. section 3.5).

En plus du suivi des *Enterobacteriaceae*, il est important de faire celui des *Salmonella* et de *Cronobacter* spp. Pour ces bactéries, la règle est simple : il ne devrait pas en être trouvé.

S'il est démontré que les opérations d'hygiène validées sont conduites de façon reproductible, la fréquence des analyses peut être réduite, avec prudence.

▪ **Étape 8 et principe 3 – Détermination des limites critiques de chaque CCP**

Non applicable.

▪ **Étape 9 et principe 4 – Déterminer le système de surveillance à chaque CCP**

Non applicable.

▪ **Étape 10 et principe 5 – Déterminer les actions correctives**

En cas de non-respect d'une procédure de nettoyage, celui-ci devrait être refait et la pertinence des procédures de surveillance devrait être réévaluée.

La quantité de contaminants microbiologiques dans l'environnement de fabrication ne renseigne pas sur la quantité de ces contaminations dans le produit fini : il n'existe pas de relation mathématique universelle pour

estimer le transfert de l'environnement au produit fini. L'établissement d'une corrélation, si elle existe, serait difficile en raison de la faible présence des contaminants microbiologiques étudiés, en conditions normales de fonctionnement. Toutefois, il n'existe aucun doute sur la responsabilité de l'environnement dans la contamination du produit fini. Par conséquent, des actions correctives devraient être prévues en cas de détection de *Salmonella* ou de *Cronobacter* ou de dépassement du niveau de référence des *Enterobacteriaceae* : le renforcement des mesures d'hygiène, des contrôles renforcés de l'environnement et du produit fini, les modalités de blocage, rappel, retrait des lots ou des parties de lot, une analyse des causes, les modalités de sortie du plan de contrôle renforcé.

▪ **Étape 11 et principe 6 (et étape 8 et principe 3) – Établir les procédures de validation et de vérification**

La validation et la vérification des PRP (nettoyage de l'environnement) consistent d'une part à réaliser une analyse microbiologique de ce qui est récupéré par le nettoyage sans eau ou au moyen d'un aspirateur manuel (« aspirette ») dédié, et d'autre part à mesurer la contamination bactériologique des surfaces sans introduire d'humidité (p. ex. sans utiliser des boîtes contact, des lingettes, des épongettes ou des écouvillons humides).

Dans le cas (exceptionnel en principe) où est fait un nettoyage en place de l'intérieur des équipements, sa validation, sa surveillance et sa vérification ne présentent pas d'originalité particulière. Toutefois, il convient d'y ajouter l'observation visuelle de l'absence de dépôt après rinçage et séchage, là où elle est possible.

Pour la vérification de l'efficacité du système HACCP, le respect des critères microbiologiques réglementaires applicables aux produits constitue un minimum. Ces critères sont décrits plus loin. Un plan d'échantillonnage renforcé peut être utile en cas de défaillance constatée, p. ex. pour le nettoyage de l'environnement.

▪ **Étape 12 et principe 7 – Constituer la documentation et la conservation des enregistrements**

Pour mémoire.

### 3.2.3. Critères microbiologiques réglementaires

La législation européenne relative aux critères microbiologiques de sécurité des aliments (Règlement (CE) n°2073/2005, Règlement (UE) 2019/229) tolère<sup>2</sup> au plus environ 1,4 ufc/kg de *Salmonella* et au plus environ 3,4 ufc/kg de *Cronobacter* spp. dans les préparations en poudre pour nourrissons (de moins de six mois pour *Cronobacter*) (Tableau 2). Le règlement inclut un critère relatif à *Listeria monocytogenes*, mais - comme il a été dit plus haut - cette bactérie n'a pas été retenue comme un danger significatif pour les préparations en poudre pour nourrissons.

Les tolérances du règlement européen sur les critères microbiologiques d'hygiène des procédés sont les suivantes : jusqu'à 500 ufc/g de *Bacillus cereus* présomptifs<sup>3</sup> et au plus environ 10 ufc d'*Enterobacteriaceae*<sup>4</sup> par kilogramme dans les préparations en poudre pour nourrissons de moins de 6 mois, environ 21 ufc/kg d'*Enterobacteriaceae* pour les préparations de suite (pour nourrissons de six à douze mois).

Il est admis que la prévalence des *Enterobacteriaceae* est un bon indicateur d'hygiène des procédés (EFSA 2007, Buchanan et Oni 2012) : les mesures d'hygiène réduisant la prévalence d'*Enterobacteriaceae* dans l'environnement de fabrication sont susceptibles de réduire la prévalence des *Cronobacter* spp.<sup>5</sup> Toutefois, il n'y a pas de corrélation généralisable entre ces deux prévalences, chaque usine étant différente. Par conséquent, le critère microbiologique de sécurité des aliments (CE 2005, UE 2019) relatif à *Cronobacter* présente une particularité, figurant dans une note. La note 14 peut être interprétée ainsi : un résultat non

<sup>2</sup> Les estimations suivantes ne donnent rien de plus qu'un ordre de grandeur. Elles ont été réalisées avec le logiciel « MPN Calculator, Build 23 by Mike Curial » sur la base des critères microbiologiques du Règlement (CE) n°2073/2005. Par exemple, lorsque la limite microbiologique *m* du critère microbiologique est « non détecté lors de l'examen de 30 prises d'essai de 10 g », le nombre le plus probable estimé est 3,4 ufc par kg.

<sup>3</sup> *Bacillus cereus* présomptifs revivifiables à 30°C selon NF EN ISO 7932.

<sup>4</sup> *Enterobacteriaceae* selon ISO 21528-1 par dénombrement à l'aide de la technique du nombre le plus probable (NPP) avec pré-enrichissement.

<sup>5</sup> Les données insuffisantes ne permettent pas de le vérifier pour *Salmonella*.

conforme pour les *Enterobacteriaceae* doit déclencher une recherche de *Cronobacter* spp. Si une corrélation est établie par une analyse statistique robuste des résultats d'analyse<sup>6</sup>, acceptée par l'autorité compétente, il n'est pas obligatoire de vérifier le respect du critère de sécurité relatif à *Cronobacter* spp. lorsque les résultats des analyses d'*Enterobacteriaceae* respectent le critère d'hygiène des procédés. D'après les informations recueillies par le groupe de travail, les industriels français ne tirent pas profit de cette possibilité, soit parce qu'il n'y a pas de corrélation soit parce qu'ils ne l'ont pas établie.

**Tableau 2.** Critères de sécurité applicables à *Salmonella* et *Cronobacter* dans les préparations en poudre pour nourrissons. Extrait du règlement CE n°2073/2005.

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes, toxines, métabolites	Plan d'échantillonnage <sup>(1)</sup>		Limites <sup>(2)</sup>		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
1.22 Préparations en poudre pour nourrissons et aliments diététiques en poudre destinés à des fins médicales spéciales pour nourrissons de moins de six mois	<i>Salmonella</i>	30	0	Non détecté dans 25 g		EN ISO 6579-1	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.23 Préparations de suite en poudre <sup>(3)</sup>	<i>Salmonella</i>	30	0	Non détecté dans 25 g		EN ISO 6579-1	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
1.24 Préparations en poudre pour nourrissons et aliments diététiques en poudre destinés à des fins médicales spéciales pour nourrissons de moins de six mois <sup>(14)</sup>	<i>Cronobacter</i> spp.	30	0	Non détecté dans 10 g		EN ISO 22964	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

(1) N = nombre d'unités constituant l'échantillon ; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs comprises entre m et M

(2) Pour ce critère, m = M.

(3) Pour les nourrissons de 6 à 12 mois

(14) Des essais en parallèle seront réalisés pour les *Enterobacteriaceae* et *Cronobacter* spp., sauf si une corrélation entre ces micro-organismes a été établie au niveau d'une usine. Si des *Enterobacteriaceae* sont détectés dans un échantillon du produit analysé dans cette usine, le lot doit être analysé pour *Cronobacter* spp. Il appartiendra au fabricant de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, s'il existe une telle corrélation entre *Enterobacteriaceae* et *Cronobacter* spp.

### 3.2.4. Résumé des mesures de maîtrise

En résumé de cette partie du rapport, la sécurité des denrées alimentaires est principalement assurée par une approche préventive : la mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication et l'application des principes HACCP (Règlement (CE) n° 178/2002).

<sup>6</sup> Il n'existe pas de corrélation applicable en toutes circonstances entre la quantité d'*Enterobacteriaceae* et celle de *Cronobacter* spp. dans l'environnement de fabrication. En revanche, une corrélation propre à un atelier industriel défini est parfois possible à établir (EFSA 2007).

Il appartient à l'industriel de réaliser l'analyse des dangers et de mettre en place les mesures de maîtrise idoines pour limiter la contamination postérieure à la pasteurisation (maîtrise de la contamination environnementale, application des règles d'hygiène par le personnel, analyses des ingrédients, ajout préférentiel de produits pasteurisés ou stérilisés, maîtrise de l'effet des nouveaux ingrédients sur l' $a_w$  et la survie des bactéries pathogènes, etc.).

En ce qui concerne les sites de production de préparations en poudre pour nourrissons, il apparaît essentiel de mettre en place et de respecter un zonage hygiénique d'intensité croissante en fonction de la vulnérabilité du produit à la contamination environnementale. Ainsi, par exemple, quatre zones peuvent être définies : zone de très haute hygiène, zone de haute hygiène, zone d'hygiène intermédiaire, et enfin zone d'hygiène de base. Au sein de chacune des trois premières zones, il existe des surfaces en contact direct avec le produit, proches (p. ex. l'extérieur d'un équipement), et des surfaces plus éloignées (p. ex. les murs, les sols, le plafond). La zone d'hygiène de base, bien qu'elle soit dissociée de la production proprement dite ne devrait pas être négligée, elle inclut les quais de déchargement des matières premières, les vestiaires du personnel, la cafétéria, etc. L'importance du zonage dans la maîtrise de *Salmonella* et *Cronobacter* dans les usines de produits alimentaires à humidité faible est soulignée dans les ouvrages généraux les concernant (ICMSF 2002b, 2018, ABC s.d., Gurtler et Keller 2019). Elle a été également rappelée par les experts audités et les industriels notamment P. McClure dans sa communication scientifique à la dernière conférence de l'IAFP-Europe (avril 2019).

Cette démarche essentielle d'analyse des dangers pourrait être facilitée par la rédaction par les professionnels d'un guide des bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP pour la fabrication des préparations en poudre pour nourrissons.

### 3.3. Analyse des quatre PMS transmis par l'administration

Au total, 501 399 tonnes de lait en poudre ont été produites en France en 2018 dont 125 862 tonnes de préparations en poudre pour nourrissons, soit 25 % de la production de poudres (CNIEL 2019). Cette production est réalisée dans quarante usines.

Le groupe de travail a expertisé quatre PMS jugés par l'administration comme représentatifs de la diversité des pratiques au sein d'usines de production de préparations en poudre pour nourrissons en France.

Des tableaux relatifs aux mesures de maîtrise figurant dans le rapport de l'AFSSA (2008) ont été actualisés et complétés par des éléments sur les conditions d'efficacité de ces mesures. Les moyens de maîtrise décrits dans les PMS ont été comparés aux actions et mesures de maîtrise listés dans ces tableaux. Le cas échéant, les limites perçues par les autorités lorsqu'elles procèdent à l'inspection de ces mesures et actions ont été prises en considération.

Cette comparaison a permis de classer les éléments décrits dans les documents de PMS en trois catégories :

- **les points forts** correspondent à des mesures ou actions qui sont bien décrites par la majorité des entreprises dans leur PMS, et répondent point par point aux actions ou mesures indiquées dans les tableaux 3 et 4. On peut considérer pour ces points que l'inspection documentaire des PMS apporte les informations nécessaires et suffisantes quant au respect des exigences sanitaires associées à la production des préparations en poudre pour nourrissons (sous réserve de vérification d'application effective lors des visites prévues par la procédure d'agrément ou d'inspection) ;
- **les points faibles** correspondent à des mesures ou actions indiquées dans les tableaux 3 et 4 qui sont indisponibles dans les documents des PMS fournis. On peut considérer pour ces points importants qu'il est nécessaire de réinterroger les entreprises en complément de l'examen documentaire afin de s'assurer que ces éléments font l'objet d'une maîtrise ;
- **les points à approfondir** correspondent à des mesures ou actions qui font l'objet d'une description insuffisante ou trop imprécise dans le PMS des entreprises et pour lesquels les inspecteurs devraient demander des compléments d'information avant de statuer. Des précisions techniques sur le déroulement des opérations ou, par exemple, sur la nature exacte des contrôles réalisés sont en général nécessaires afin de statuer en toute connaissance de cause sur la maîtrise effective du procédé. Pour ces points particuliers, l'imprécision des documents transmis devrait être levée (fourniture de documents complémentaires ou information disponible lors de l'inspection sur site).

Note importante : le classement en points faibles ou à approfondir ne signifie aucunement que ces mesures ne sont pas appliquées dans ces établissements. En effet, des précisions et informations complémentaires, qui tendent à prouver que des mesures non indiquées dans le PMS sont bien mises en œuvre, ont été apportées par deux usines de production.

Le détail des commentaires sur les mesures de maîtrise figure dans les tableaux 3 et 4.

### **3.3.1. Points forts**

Les actions et mesures suivantes sont bien documentées dans les PMS fournis :

- zonage : identification matérielle des zones et restriction d'accès, notamment installation de sas pour le personnel ;
- gestion des nuisibles (insectes, rongeurs, oiseaux, etc.) : mise en place de systèmes efficaces de destruction et de piégeage ;
- qualité de l'eau utilisée lors des procédures de nettoyage et de désinfection ;
- hygiène du personnel :
  - attribution de postes en zones définies ;
  - respect des procédures vestimentaires (vêtements de couleurs différentes) ;
  - respect des procédures d'hygiène du personnel extérieur (maintenance, contrôles, audit, etc.) ;
- matières premières et ingrédients :
  - établissement de critères technologiques, physico-chimiques et microbiologiques ;
  - traçabilité des produits utilisés, y compris les ingrédients ;
  - suivi des cahiers des charges :
    - audits réguliers par du personnel qualifié ;
    - analyses microbiologiques ;
    - contrôles à réception permettant d'évaluer l'acceptabilité de la livraison ;
    - procédure de consignation ou de quarantaine en cas d'évaluation défavorable ;
- méthodes d'analyse :
  - 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.

### **3.3.2. Points à approfondir**

Les mesures ou actions suivantes font l'objet d'une description insuffisante dans les PMS expertisés :

- validation et vérification de l'efficacité des plans de nettoyage et de désinfection ;
- vérification et suivi régulier des résultats et de l'efficacité de la procédure de gestion des nuisibles ;
- élaboration et mise en œuvre d'une procédure de qualification des fournisseurs ;
- plan d'analyses microbiologiques des produits finis : définition d'objectifs pour *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* et *Cronobacter* en fonction de l'analyse des dangers, des réglementations en vigueur et de l'historique de l'entreprise, définition des lots, représentativité des échantillons transmis aux laboratoires, prises d'essai des laboratoires, méthodes d'analyses ;
- plan d'analyses microbiologiques de l'environnement : définition d'objectifs pour *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* et *Cronobacter* en fonction de l'analyse des dangers et de l'historique de l'entreprise, modes opératoires pour la réalisation des prélèvements environnementaux, protocoles analytiques des laboratoires ;



- méthodes analytiques (regroupement des prises d'essai ou « pooling ») : constitution des prises d'essai des laboratoires ;
- analyse des tendances : suivi régulier du nombre d'*Enterobacteriaceae* aux différents stades de la chaîne de production.

### 3.3.3. Points faibles

Des informations sur les mesures suivantes ne figurent pas dans les PMS expertisés :

- zonage :
  - vérification de l'absence d'eau et enregistrement de l'hygrométrie en zone sèche ;
  - veiller à ce que la zone sèche soit en surpression, notamment par rapport à la zone humide ;
- conception hygiénique des locaux et du matériel : description insuffisante des locaux ;
- l'élimination de l'eau après un nettoyage et désinfection en zone sèche ;
- filtration de l'air : vérification du taux d'encrassement des filtres (maintenance préventive) ;
- personnel :
  - visite médicale d'embauche ;
  - formations et informations régulières ;
  - formations spécifiques pour certains postes sensibles ;
- l'hygiène du conditionnement des poudres : vérification du degré de séchage de l'intérieur des containers (si utilisés), caractéristiques microbiologiques des contenants, suivi de l' $a_w$  du produit et l'hygrométrie des locaux au cours du stockage ;
- protocole des prélèvements des échantillons environnementaux ;
- la mise en place d'un plan de contrôle renforcé en cas de non-conformité des résultats.

Les conclusions de l'analyse des quatre PMS sont en accord avec le bilan du plan d'inspection conduit par la DGAL en 2018 (19 établissements inspectés)(DGAL 2019).

Les principales mesures de maîtrise semblent connues des entreprises ayant communiqué leur PMS. Cependant, à la lecture des PMS, les mesures classées en points faibles ou à approfondir devraient faire l'objet d'une attention particulière lors des inspections.

En effet, les PMS étudiés ne décrivent pas de façon complète la validation et la vérification des procédures de nettoyage et de désinfection, le suivi de la gestion des nuisibles, la qualification des fournisseurs, le plan d'analyses microbiologiques et les procédures détaillées de ces dernières, et l'analyse des tendances.

En outre, des insuffisances ou même l'absence d'information dans les PMS peuvent concerner la surveillance de l'hygrométrie et de la pression d'air dans les zones de très haute hygiène, la conception hygiénique des locaux et des équipements, la filtration de l'air, la surveillance de la santé du personnel et la formation de ce dernier aux activités en zones sensibles, l'hygiène du conditionnement des poudres, le prélèvement des échantillons dans l'environnement de fabrication, les conséquences en cas de non-conformité des résultats des analyses de l'environnement.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2018-SA-0264**  
Saisine liée n° 2005-SA-0313

**Tableau 3.** Principales mesures de maîtrise à appliquer au cours des étapes de production – conclusions de l'analyse des PMS, conditions d'efficacité et attendus pour l'inspection

Étapes et lieux	Points à surveiller	Actions, mesures de maîtrise et surveillance	Analyse des PMS		Conditions d'efficacité <sup>(1)</sup> et attendus
			Classement	Commentaires	
Locaux et équipements	Zonage : séparation des zones humides et sèches	Identification matérielle des zones et restriction d'accès, notamment installation de sas pour le personnel.	Point fort	Les plans sont fournis et on y retrouve les informations claires sur le zonage, les accès, les portes, sens de circulation, et sas etc.	Respect des consignes par le personnel. Gérer correctement le transfert par les matériels et notamment ceux qui sont mobiles (avec ou sans roues). Prévoir des barrières physiques pour protéger les zones de haute ou très haute hygiène. <b>Attendus :</b> Présence et respect par le personnel des plans de zonage et des procédures.
		Vérification de l'absence d'eau et enregistrement de l'hygrométrie en zone sèche.	Point faible	Ce point n'est pas décrit par toutes les entreprises dans les documents transmis.	Matériel en état de marche et correctement étalonné. Prévoir une redondance si nécessaire. La mesure de l'humidité dans les airs comprimés ne devrait pas être oubliée. <b>Attendus :</b> Présence et respect par le personnel des plans de zonage et des procédures.
	Zonage : organisation des flux d'air	Veiller à ce que la zone sèche soit en surpression, notamment par rapport à la zone humide.	Point faible		Le flux ne devrait pas être inversé ou modifié par des déplacements de personnels ou de matériels avec de multiples ouvertures de portes. La ventilation ne devrait pas se faire par l'ouverture de portes ou de fenêtres. <b>Attendus :</b> Présence et respect par le personnel des plans de zonage et des procédures.
	Murs, sols, plafonds et matériel	- 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.	Point faible	Les documents ne contiennent en général aucune description des matériaux utilisés (inox, carreaux céramique, béton, parpaings, cloisons sandwich, résines diverses ?).	Prendre en compte l'esprit de la conception originale avant de la modifier pour ne pas, par exemple, modifier les flux d'air et augmenter les transferts des contaminations d'une zone à l'autre. Un soin particulier devrait être apporté aux caniveaux et aux joints des carrelages. <b>Attendus :</b> - Les locaux et matériels doivent être bien conçus. - Description précise des matériaux utilisés pour les équipements et les locaux notamment ceux en contact avec les produits.
	Nettoyage et désinfection	Application de plans efficaces et validés.	Point à approfondir	Ce point est décrit par l'ensemble des entreprises dans les documents transmis. Cependant la	<b>Attendus :</b> - Présence d'un plan de nettoyage validé (présence d'une procédure de validation et d'un document indiquant la validation des procédures de nettoyage).

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2018-SA-0264**  
Saisine liée n° 2005-SA-0313

Étapes et lieux	Points à surveiller	Actions, mesures de maîtrise et surveillance	Analyse des PMS		Conditions d'efficacité <sup>(1)</sup> et attendus
			Classement	Commentaires	
				notion de validation de ces plans n'est jamais abordée.	- Application du plan de nettoyage validé (produits, doses, temps de contact...) - Vérification et revalidation régulière.
		Utilisation de matériels de nettoyage d'entretien facile (brosses, balais) <sup>(2)</sup>	Nouvelle recommandation non évaluée dans les PMS		Le matériel ne devrait pas présenter de cavités ou d'endroits non nettoyables. <b>Attendus :</b> Présence de descriptifs des matériels de nettoyage.
		Élimination de l'eau si un nettoyage et une désinfection humide sont réalisés en zone sèche.	Point faible	Ce point n'est pas décrit par l'ensemble des entreprises dans les documents transmis. Or, il s'agit d'un élément essentiel permettant de limiter le développement bactérien dans les locaux ou équipements.	Absence de recoins difficiles à sécher ou dont le contrôle est ardu. <b>Attendus :</b> - Présence d'instructions décrivant les actions à mener pour vérifier l'absence d'eau (raclage, temps d'attente...) - Pente des sols adaptée pour éviter les collections d'eau.
		Vérification de l'efficacité des opérations : - inspection visuelle (eau, dépôts) <sup>(2)</sup> ; - 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.	Point à approfondir	Des plans de contrôle sont fournis indiquant plus ou moins précisément les lieux de prélèvements. Cependant le descriptif de la technique de prélèvement et du type d'échantillon obtenu est généralement insuffisant. Les entreprises utilisent des doseurs automatiques de produits de nettoyage-désinfection.	Produits efficaces, notamment par l'utilisation conjointe de détergents acides et basiques. Les analyses microbiologiques doivent être réalisées suivant des protocoles validés par un laboratoire compétent. <b>Attendus :</b> Descriptif précis des opérations de contrôle environnementaux et si possible un document de synthèse sur l'ensemble des contrôles visant à valider ou vérifier le plan de nettoyage.
	Nuisibles (insectes, rongeurs, oiseaux, etc.)	Mise en place de systèmes efficaces de destruction et de piégeage.	Point fort	Les activités de maîtrise des nuisibles sont confiées à des prestataires extérieurs. Des contrats sont disponibles. Les entreprises se reposent sur la prestation externe. Un	Mise en place aux points d'entrée. Intégrer les ventilations. Les points de pénétration doivent être testés (lumière, fumée). <b>Attendus :</b> - Présence d'un plan de lutte contre les nuisibles adapté à la situation et appliqué (mesures préventives et curatives). - Vérification du fonctionnement des matériels.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2018-SA-0264**  
Saisine liée n° 2005-SA-0313

Étapes et lieux	Points à surveiller	Actions, mesures de maîtrise et surveillance	Analyse des PMS		Conditions d'efficacité <sup>(1)</sup> et attendus
			Classement	Commentaires	
				plan de la répartition des pièges est fourni dans certains PMS.	- infrastructure adaptée (absence de trous et passages dans les murs, sols et plafonds, moustiquaires, portes automatiques...).
		Vérification et suivi régulier des résultats et de l'efficacité de la procédure.	Point à approfondir	Ce point n'est pas décrit par toutes les entreprises dans leur PMS. Parfois le sous-traitant procède à divers comptages.	La sous-traitance par un tiers devrait être attentivement surveillée. L'utilisation de pièges à phéromones ou de procédés modernes (vidéo) améliore la détection de l'infestation. <b>Attendus :</b> - Présence d'une procédure décrivant l'évaluation de l'efficacité des mesures de lutte (comptages, captures...). - Exploitation des rapports d'intervention des sociétés sous-traitante.
	Filtration de l'air	Vérification du taux d'encrassement des filtres (maintenance préventive).	Point faible	Ce point n'est décrit par aucune des entreprises alors que l'efficacité du filtrage de l'air de certains locaux a une incidence importante sur le risque de contamination.	Filtres à performance connue et vérifiée. Étudier l'intérêt de filtres à usage unique. <b>Attendus :</b> Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre
	Qualité de l'eau utilisée	Suivi microbiologique régulier.	Point fort	Ce point est décrit de façon plus ou moins détaillée par les entreprises dans leurs documents.	La qualité de l'eau entrante devrait être connue. S'il existe un traitement complémentaire, son efficacité devrait être surveillée si possible en temps réel et vérifiée par des analyses complètes. La maintenance des réseaux devrait être effectuée selon les recommandations du Centre scientifique et technique du bâtiment. Les bras morts du réseau d'eau doivent être éliminés. <b>Attendus :</b> - Existence de plans de réseaux. - Présence d'une analyse des risques liés à la dégradation de la qualité de l'eau et analyses régulières. - Maintenance régulière du réseau (purges, entretien de la fontainerie et des dispositifs antiretour...). - Conformité des matériaux, produits et procédés de traitement.
Personnel	Degré de qualification du personnel permanent, saisonnier et intérimaire aux	Visite médicale d'embauche.	Point faible	La majorité des entreprises omettent de fournir leur procédure d'embauche ainsi qu'un descriptif de la gestion des visites médicales.	Elle devrait concerner les intérimaires avant leur prise de poste. <b>Attendus :</b> Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre notamment pour les personnels intérimaires et saisonniers.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2018-SA-0264**  
Saisine liée n° 2005-SA-0313

Étapes et lieux	Points à surveiller	Actions, mesures de maîtrise et surveillance	Analyse des PMS		Conditions d'efficacité <sup>(1)</sup> et attendus
			Classement	Commentaires	
	principes généraux d'hygiène	Formation et informations régulières.  Formations spécifiques pour certains postes sensibles.	Point faible	Ce point est décrit en détail par peu d'entreprises, alors que le personnel devrait appliquer de nombreuses procédures internes.	Supports faciles à comprendre et actualisés. Retour d'expérience pour chaque non-conformité Les autocontrôles microbiologiques devraient être accompagnés d'un descriptif précis des conditions de production au moment de la réalisation du prélèvement afin de réaliser une interprétation pertinente et permettre la formation du personnel en cas de mauvaises pratiques. <b>Attendus :</b> - Plan de formation décrit précisément et réellement mis en œuvre. - Contenu pertinent et actualisé des formations techniques.
		Attribution de postes en zones définies.	Point fort	Ce point est bien décrit par l'ensemble des entreprises dans les documents transmis.	Respect des postes par le personnel. Traçabilité des suppléances éventuelles. <b>Attendus :</b> - Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre.
		Respect des procédures vestimentaires (vêtements de couleurs différentes)	Point fort	Ce point est bien décrit par l'ensemble des entreprises dans les documents transmis.	Vêtements en quantité suffisante et correctement entretenus par l'entreprise. <b>Attendus :</b> - Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre.
Personnel	Accès de personnel extérieur (maintenance, contrôles, audit, etc.)	- Respect des procédures d'hygiène. - Informations et recommandations relatives au comportement et à la gestuelle.	Point fort	Ce point est bien décrit par l'ensemble des entreprises dans les documents transmis.	Le personnel extérieur devrait être supervisé par du personnel de l'entreprise et informé précisément des mesures d'hygiène à respecter. <b>Attendus :</b> - Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre.
Matières premières et ingrédients	Fournisseurs	Élaboration et mise en œuvre d'une procédure de qualification des fournisseurs.	Point à approfondir	La qualification des fournisseurs n'est pas décrite dans les documents fournis par les entreprises. Des cahiers des charges sont cependant disponibles. Il serait préférable que les entreprises précisent sur quelles bases elles qualifient leurs fournisseurs en dehors de la fourniture	Bien identifier les changements de matières premières ou de composition des matières premières. Écarter les fournisseurs ne respectant pas les exigences. <b>Attendus :</b> - Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre. - Présence d'analyses sur les matières premières réalisées par l'entreprise et les fournisseurs.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2018-SA-0264**  
Saisine liée n° 2005-SA-0313

Étapes et lieux	Points à surveiller	Actions, mesures de maîtrise et surveillance	Analyse des PMS		Conditions d'efficacité <sup>(1)</sup> et attendus
			Classement	Commentaires	
				de produits respectant les cahiers des charges.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Établissement de critères technologiques, physico-chimiques et microbiologiques.</li> <li>- Traçabilité des produits utilisés, y compris les ingrédients.</li> </ul>	Point fort	Les cahiers des charges ou les spécifications des ingrédients sont disponibles.	Réalisation d'analyses libératoires par le fournisseur ou l'industriel en cas de non-réalisation chez le fournisseur. <b>Attendus :</b> Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre.
	Suivi des cahiers des charges	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Audits réguliers par du personnel qualifié.</li> <li>- Analyses microbiologiques</li> <li>- Contrôles à réception permettant d'évaluer l'acceptabilité de la livraison.</li> <li>- Procédure de consigne ou de quarantaine en cas d'évaluation défavorable.</li> </ul>	Point fort	Ce point est décrit par l'ensemble des entreprises dans les documents transmis.	Prévoir du stock pour pouvoir se donner les moyens de refuser une livraison. <b>Attendus :</b> Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre.
Traitement thermique (pasteurisation)	Barèmes appliqués lors du traitement	Enregistrement des barèmes temps/température.	Points de vigilance (compte tenu de son aspect critique)	Ce point est décrit par la majorité des entreprises dans les documents transmis. Ce point permettant de s'assurer de la maîtrise du principal CCP identifié par les entreprises, il reste fondamental que ce contrôle soit décrit dans le PMS.  En cas de doute des documents complémentaires devraient être impérativement exigés lors de l'inspection documentaire du PMS	Étalonnage des appareils de mesure et d'enregistrement. Prévoir éventuellement une redondance. <b>Attendus</b> Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre. En cas de doute, des documents complémentaires devraient être impérativement exigés lors de l'inspection documentaire du PMS.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2018-SA-0264**  
Saisine liée n° 2005-SA-0313

Étapes et lieux	Points à surveiller	Actions, mesures de maîtrise et surveillance	Analyse des PMS		Conditions d'efficacité <sup>(1)</sup> et attendus
			Classement	Commentaires	
Conditionnement des poudres	Qualité des containers	Vérification du degré de séchage de l'intérieur des containers.	Point faible	Ce point n'est décrit par aucune entreprise dans les PMS transmis. Il est cependant possible qu'il ne soit pas adapté aux pratiques des entreprises dont le PMS a été étudié car certaines utilisent des sacs papier pour 25 kg ou des big bags. Il faut cependant noter que la qualité de ces derniers consommables ou leur contrôle ne sont pas non plus décrits dans les PMS fournis.	Privilégier le stockage des contenants intermédiaires (big bag) à une zone d'hygiène et d'hygrométrie équivalente à celui du conditionnement. <b>Attendus :</b> Mesure de maîtrise du suivi de l'a <sub>w</sub> du produit, de l'hygrométrie des locaux et du séchage des contenants destinés à stocker la poudre en sortie de tour de séchage, décrites précisément par une procédure ou un document technique et réellement mises en œuvre. Le suivi de l'a <sub>w</sub> de la poudre devrait être effectué de manière standardisée (endroit de prélèvement : surface, mi-hauteur et fond du big bag). Il semble utile que cette mesure d'a <sub>w</sub> soit couplée systématiquement à une mesure de température et d'humidité relative de l'air.
		- Caractéristiques microbiologiques des contenants (intérieur et extérieur) <sup>(2)</sup> - Au cours du stockage, suivi de l'a <sub>w</sub> du produit et de l'hygrométrie des locaux <sup>(2)</sup>	Nouvelle recommandation non évaluée dans les PMS		

<sup>(1)</sup> Les mesures de maîtrise doivent être validées, surveillées et vérifiées, c'est la condition de leur efficacité. Elles doivent être sans cesse évaluées et réajustées si nécessaire. L'identification des dérives doit être réalisée très rapidement par des audits fréquents en production.

<sup>(2)</sup> Actualisation du rapport de 2008.

**Tableau 4.** Actions pouvant être menées sur le plan microbiologique - conclusions de l'analyse des PMS et attendus pour l'inspection<sup>(1)</sup>

Points essentiels	Modes d'action	Analyse des PMS		Attendus
		Classement	Commentaires	
Plan d'analyses microbiologiques des produits finis	Définition d'objectifs pour <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella</i> et <i>Cronobacter</i> en fonction de l'analyse des dangers, des réglementations en vigueur et de l'historique de l'entreprise	Point à approfondir	Toutes les entreprises mentionnent la réalisation d'analyses sur les produits finis pour ces différentes bactéries. Cependant, il est difficile d'avoir une vision de synthèse sur les plans d'échantillonnage utilisés, sur la nature des échantillons constitués (volume, représentativité, définition des lots associés à ces échantillons) à la seule lecture des documents. Certaines entreprises ne fournissent pas un récapitulatif des analyses programmées et réalisées. Il n'y a pas d'indication précise sur les prises d'essai des laboratoires pour les recherches d'agents pathogènes alors que cela a une incidence importante sur la sensibilité des méthodes d'analyses appliquées.	- Présence d'un document de synthèse décrivant l'intégralité du plan de contrôle, des modes opératoires pour la réalisation des prélèvements environnementaux, et un descriptif précis des protocoles analytiques des laboratoires.
Plan d'analyses microbiologiques de l'environnement	Définition d'objectifs pour <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella</i> et <i>Cronobacter</i> en fonction de l'analyse des dangers et de l'historique de l'entreprise.	Point à approfondir	Tous les dossiers transmis indiquent bien la réalisation d'analyses de contrôle de l'environnement pour ces différentes bactéries et parfois d'autres (ASR, staphylocoques, etc). Comme pour le plan de contrôle des produits finis, il est difficile d'avoir une vision d'ensemble du plan de contrôle. La description des protocoles de prélèvements est très succincte voire inexistante, alors que cette modalité a une grande importance sur la possibilité d'utiliser le résultat.	- Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre. - Présence d'un document de synthèse décrivant l'intégralité du plan de contrôle, des modes opératoires pour la réalisation des prélèvements environnementaux, et un descriptif précis des protocoles analytiques des laboratoires.
Protocole des prélèvements des échantillons environnementaux	Note explicative de la procédure (affichage, diffusion).	Point faible	On ne trouve pas toujours de description précise de la façon dont le prélèvement est réalisé.	- Descriptif complet des protocoles de prélèvements compte tenu de l'importance de ces contrôles environnementaux.
Méthodes analytiques	- 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.	Point fort	Ce point est bien décrit par l'ensemble des entreprises dans les documents transmis. Il reste à bien distinguer ce qui concerne l'utilisation de méthodes d'analyses utilisant des réactifs et des protocoles ayant fait l'objet d'une validation selon NF EN ISO 16140 et le fait que le laboratoire réalise ces analyses sous accréditation. L'accréditation sous-entend, en toute logique, que le laboratoire respecte l'intégralité du protocole d'analyse préconisé et utilise des prises d'essai prévues par ce protocole à l'exclusion de tout autre. La plupart des entreprises confient les recherches de bactéries pathogènes à des laboratoires extérieurs.	- Mesure de maîtrise décrite précisément par une procédure ou un document technique et réellement mise en œuvre.



**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2018-SA-0264**  
Saisine liée n° 2005-SA-0313

Points essentiels	Modes d'action	Analyse des PMS		Attendus
		Classement	Commentaires	
	S'il est démontré (sous la responsabilité de l'exploitation en l'absence de méthodes normalisées) que le regroupement (« pooling ») des prises d'essai n'affecte pas la limite de détection et la sensibilité de l'analyse pour <i>Cronobacter</i> , il peut être pratiqué.	Point à approfondir	Ce point n'est pas correctement décrit dans les PMS fournis. Les documents n'abordent pas la constitution des prises d'essai des laboratoires alors que l'incidence sur la sensibilité des analyses est majeure. Par ailleurs, le fait qu'une méthode d'analyse utilisée soit de référence ou soit validée NF EN ISO 16140 par rapport à une méthode de référence ne signifie pas obligatoirement que le laboratoire applique intégralement le protocole prévu, en particulier pour la constitution des prises d'essai, ou le respect de l'intégralité des étapes prévues par le protocole. Les méthodes pour lesquelles la constitution de prises d'essai de plus de 10 ou 25 g a fait l'objet d'une validation NF EN ISO 16140 sont peu nombreuses à la date de rédaction du rapport. Donc, en dehors des quelques réactifs concernés, le regroupement des prises d'essai n'est pas acceptable, et un laboratoire accrédité doit respecter les prises d'essai prévues par les dossiers de validation. L'information précise sur la nature des prises d'essai ou leur regroupement est importante pour décider de la fiabilité du plan de contrôle	- Descriptif précis des opérations de « pooling » et de la constitution des prises d'essai afin de vérifier l'application effective de la norme.
Analyse des tendances	Suivi régulier du nombre d' <i>Enterobacteriaceae</i> aux différents stades de la chaîne de production (points sensibles identifiés).	Point à approfondir	Ce point est décrit par la moitié des entreprises dans les PMS fournis alors que l'utilisation d'un tel paramètre, plus sensible qu'une recherche de pathogène, est en mesure d'alerter plus sûrement quant à l'émergence possible d'une contamination du produit par un pathogène. Les entreprises ne décrivent pas de système d'analyse des tendances dans les résultats ou de cartes de contrôles. Des entreprises utilisent éventuellement d'autres paramètres analytiques (ASR, etc.).	- Exploitation au cours du temps des résultats d'autocontrôle pour réaliser un suivi de tendance.
	Mise en place de protocoles d'échantillonnage plus important, dans l'espace et dans le temps, en cas de non-conformité des résultats.	Point faible	Ce point est décrit par certaines entreprises.	Descriptif des mesures mises en place lorsque les contrôles environnementaux et, <i>a fortiori</i> , les contrôles de produits finis mettent en évidence une non-conformité. Il faut cependant noter que les actions mises en place peuvent également passer par d'autres mesures que des analyses renforcées.

(1) les conditions d'efficacité sont détaillées dans les sections 3.4.3.2 et 3.6

### 3.4. Apport et limites du contrôle microbiologique du produit fini

#### 3.4.1. Préambule

On observe généralement dans les usines que :

- de façon automatique à intervalles de temps réguliers, de la poudre extraite du conduit où elle circule avant son conditionnement est collectée dans un contenant approprié. De ce dernier, transféré au laboratoire, sont prélevés les quantités de poudre qui seront analysées ;

ou bien :

- des unités (p.ex. des boîtes métalliques) prêtes à la mise en vente sont prélevées sur la chaîne de conditionnement et transférées au laboratoire. On y prélève ensuite les quantités de poudre qui seront analysées.

Les quantités de poudre destinées à être analysées seront appelées ci-après **prises d'essai**. C'est la sélection de prises d'essai dans un lot d'aliment, de telle sorte que les prises d'essai sélectionnées soient représentatives de ce lot, qui est appelée **échantillonnage**. L'ensemble des prises d'essai constitue l'**échantillon**, et le nombre  $n$  de prises d'essai est appelé **taille de l'échantillon**. Le **plan d'échantillonnage** tient compte des performances des méthodes d'analyse ainsi que des hypothèses sur la répartition des contaminants dans la poudre (homogène ou non) et est constitué des éléments suivants :

- le caractère régulier ou aléatoire des prélèvements,
- la taille de l'échantillon ( $n$ ),
- la masse des prises d'essai ( $m$ ),
- le nombre acceptable de prises d'essai ( $c$ ) non conformes (dans ce qui suit,  $c = 0$ ).

#### 3.4.2. Objectifs

Le but d'un plan d'échantillonnage du produit fini peut être : (i) de détecter une éventuelle contamination du produit fini par une bactérie pathogène (*Salmonella*, *Cronobacter* spp), (ii) de suivre dans le temps et dans l'espace le niveau de contamination par des indicateurs d'hygiène (*Enterobacteriaceae*).

Selon le contexte, trois objectifs différents peuvent être poursuivis ; ils sont associés à des plans d'échantillonnage différents.

1. **Mise en place d'un historique.** Le plan associé à cet objectif est réalisé sur une période longue (par ex., six mois). Il vise à connaître le(s) procédé(s) de fabrication de l'usine et son(leur) influence sur la variabilité (par ex. spatiale et temporelle) d'éventuelles contaminations du produit fini par une bactérie pathogène, ainsi que par des bactéries indicatrices d'hygiène. Cette connaissance sert à renseigner certains paramètres (c'est-à-dire caractéristiques de la contamination) des plans de contrôle de routine ou renforcé.
2. **Contrôle de routine.** Le plan associé à cet objectif vise à surveiller la contamination (de l'environnement comme du produit fini) par des bactéries pathogènes ou indicatrices d'hygiène, tant que toutes les analyses de l'environnement et du produit fini sont conformes.
3. **Contrôle renforcé.** Le plan associé à cet objectif vise d'une part à rechercher dans l'environnement la (es) cause(s) de contamination du produit fini par des bactéries pathogènes, d'autre part à contrôler la conformité du produit fini avant sa mise sur le marché tant que le retour à la normale n'est pas assuré. Pour cet objectif, l'utilisation de données analytiques de caractérisation moléculaire peut être très informative (cf. section 3.6.3).

Quel que soit l'objectif, la surveillance du produit fini est réalisée à l'échelle d'un **lot**. On entend par lot un ensemble d'unités de vente d'une denrée alimentaire - homogène et de formulation stable - produite, fabriquée ou conditionnée dans des circonstances pratiquement identiques. La fabrication d'un lot de préparation en poudre pour nourrissons s'étend souvent sur une période de quelques heures mais en général de moins de 24 h et à une masse comprise entre quelques tonnes à des dizaines de tonnes (informations fournies par les industriels auditionnés).

### 3.4.3. Construction du plan d'échantillonnage

L'efficacité d'un plan d'échantillonnage se mesure par sa probabilité de détecter un lot contaminé qui dépend de plusieurs paramètres, classés en trois catégories :

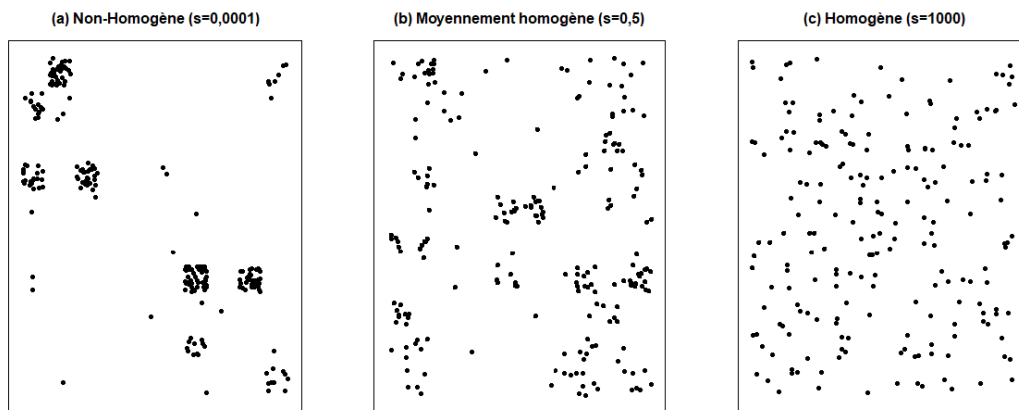
- les caractéristiques de la contamination (section 3.4.3.1) ;
- la performance de la méthode d'analyse (section 3.4.3.2) ;
- le mode d'échantillonnage (section 3.4.3.3).

L'ensemble de ces paramètres va influencer sur l'échantillonnage.

#### 3.4.3.1. Caractéristiques de la contamination

La contamination bactérienne peut être caractérisée par deux paramètres :

- $\mu$  : la densité de contamination (ufc/kg),
- $s$  : l'hétérogénéité spatiale de la contamination (valeur comprise entre 0 et l'infini ; par ex.  $s=0,001$  correspond à très hétérogène, 1000 correspond à homogène). Cette répartition spatiale, plus ou moins homogène, est illustrée par la figure 2.



**Figure 2** : illustration de la répartition spatiale de la contamination bactérienne.

(a) répartition spatiale non homogène ( $s=0,0001$ ), (b) répartition spatiale moyennement homogène ( $s = 0,5$ ) et (c) répartition spatiale homogène ( $s = 1000$ ).

Pour définir ces paramètres, plusieurs solutions peuvent être utilisées :

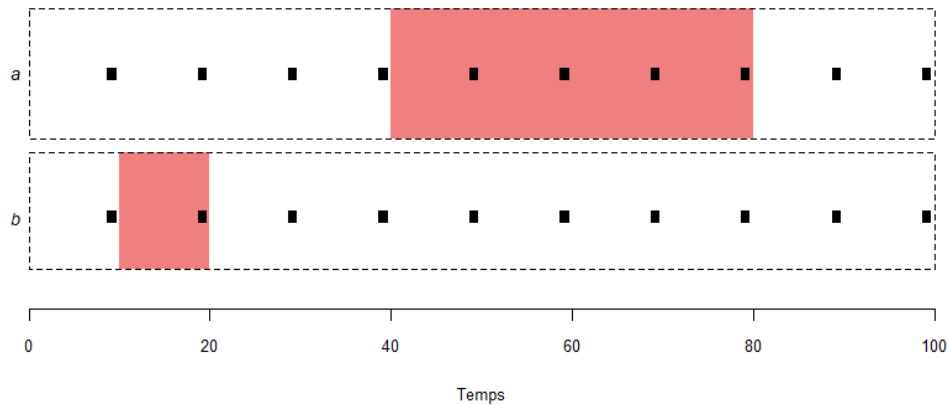
- l'analyse du procédé de fabrication de l'usine (connaissances des ingénieurs, techniciens, centres techniques) ;
- la prise en compte d'événements à risque (par ex., ajout d'une nouvelle matière première qui pourrait conditionner la densité ainsi que l'homogénéité de cette contamination) ;
- la valorisation des données issues d'autocontrôles.

Si aucune connaissance de ces paramètres n'est disponible, le scénario aboutissant au plus grand nombre de prises d'essai sera choisi (c'est-à-dire en faisant l'hypothèse que la densité de contamination est faible et sa répartition spatiale est hétérogène). Une aide au choix de ces valeurs est proposée dans le paragraphe 3.4.4.

En comparaison au rapport de l'AFSSA (2008), trois améliorations sont proposées :

- le nouveau paramètre «  $s$  » décrit ci-dessus. Dans le rapport précédent, cette répartition spatiale était supposée homogène dans la fraction du lot supposée contaminée (c'est-à-dire  $s > 1000$ ) ;
- la fraction du lot contaminée ( $p$ ) --- généralement difficile à estimer et fixée à titre d'exemple dans le rapport précédent à 2 % -- est à présent déduite des deux paramètres  $\mu$  et  $s$  ;

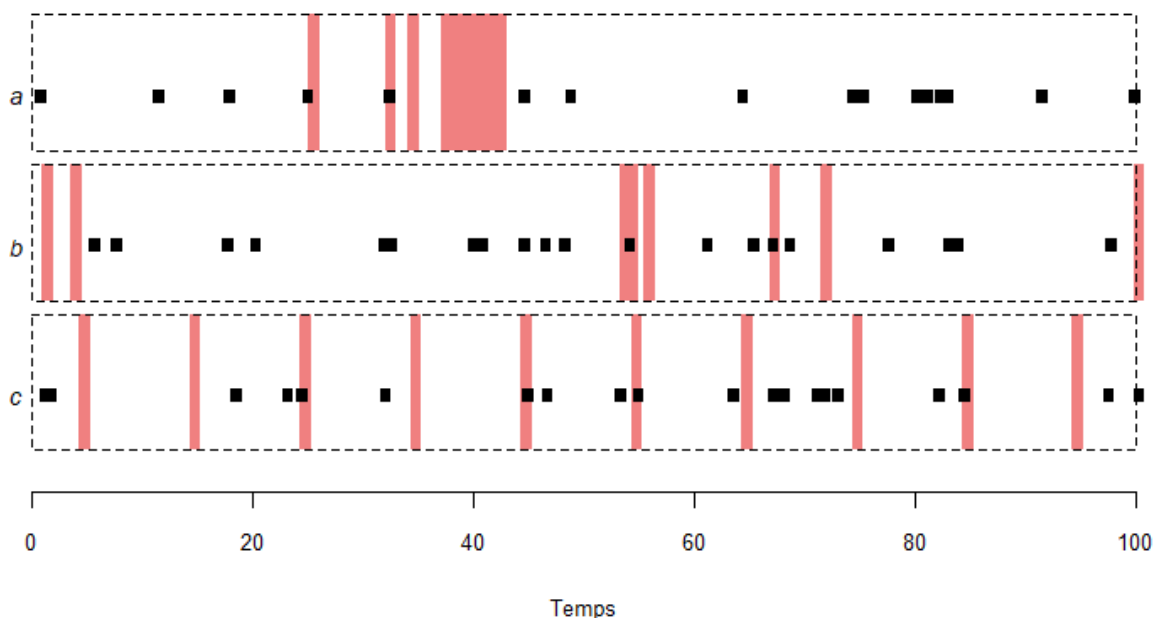
- dans le rapport précédent, la contamination était supposée ponctuelle (accidentelle). L'hypothèse que la partie du lot contaminée soit groupée dans le temps, utilisée par Habraken, Mossel, et van den Reek (1986), est jugée trop restrictive par le groupe de travail. Cette hypothèse conduisait à recommander dans le rapport précédent un échantillonnage systématique à intervalles de temps réguliers (Figure 3).



**Figure 3.** Illustration de deux cas de contamination bactérienne ponctuelle (en rouge).

(a) contamination ponctuelle avec une forte proportion de partie contaminée (40 % du lot) ; (b) contamination ponctuelle avec une faible proportion de partie contaminée (10 % du lot). Les prélèvements des prises d'essai à intervalles de temps réguliers sont illustrés par des carrés noirs.

Dans le présent rapport, la répartition temporelle de la contamination est considérée comme non ponctuelle (la figure 4 fournit trois exemples de cette répartition). Pour couvrir l'ensemble des situations, un échantillonnage aléatoire (au cours du temps) est recommandé (Jongenburger, Bassett, *et al.* 2012, Jongenburger *et al.* 2011, Jongenburger, Reij, *et al.* 2012). Cet échantillonnage aléatoire permet de couvrir plus de situations rencontrées dans la réalité. Il couvre par exemple, les trois situations illustrées par la figure 4.



**Figure 4.** Illustration de trois cas de contamination bactérienne temporellement non-groupée (en rouge ; pour les trois cas : 10 % du lot est contaminé).

(a) contamination non ponctuelle et répartie de façon concentrée et aléatoire sur la période de fabrication, (b) contamination non ponctuelle et répartie de façon aléatoire sur la période de fabrication, (c) contamination non ponctuelle et répartie de façon uniforme sur la période de fabrication. Les prises d'essai prélevées aléatoirement au cours du temps sont illustrées par des carrés noirs.

### 3.4.3.2. Incidence de la performance des méthodes d'analyse sur l'efficacité du plan d'échantillonnage

Pour réaliser les analyses microbiologiques sur les produits finis, les laboratoires doivent utiliser les méthodes exigées par le règlement (CE) n°2073/2005. Ces méthodes sont :

- soit les méthodes de référence indiquées dans l'annexe I du règlement ;
- soit des méthodes alternatives validées par rapport aux méthodes de référence selon le protocole établi par la norme NF EN ISO 16140-2. 2 (ou tout protocole analogue reconnu internationalement). Leur mise en œuvre est généralement plus aisée que celle des méthodes de référence.

Qu'elles soient « de référence » ou « alternatives validées », les méthodes d'analyse ont des caractéristiques de performance qui affectent l'efficacité des plans d'échantillonnage mis en œuvre. Les principales caractéristiques de performance de ces méthodes et référentiels de validation ont été rappelées en détail dans la note de l'Anses du 19 avril 2018 (ANSES 2018). Les méthodes alternatives commercialisées disponibles fin 2018 ont été présentées dans cette note, en fonction de leur principe (cultural, moléculaire, immunologique). Les sites Internet des organismes de certification doivent être consultés pour prendre connaissance de la mise à jour régulière des listes des méthodes alternatives validées au regard de chaque agent pathogène considéré.

Des formes viables non cultivables de *Salmonella* et *Cronobacter* peuvent être rencontrées potentiellement dans les environnements secs et dans les préparations en poudre pour les nourrissons. Des méthodes PCR améliorées peuvent permettre de les détecter sous réserve de leur validation préalable selon la norme ISO 16140-2 (ANSES 2018).

Les caractéristiques de performance d'une méthode qualitative (détection / non détection) de référence sont notamment évaluées à partir d'échantillons volontairement contaminés ou non contaminés ou encore contaminés par d'autres bactéries. Les méthodes alternatives sont caractérisées, quant à elles, comparativement à la méthode de référence.

Ainsi, la méthode de référence de recherche des salmonelles, décrite dans la norme NF EN ISO 6579-1:2017, a une spécificité (capacité de la méthode à donner un résultat négatif lorsque l'échantillon est non contaminé) de 100 % sur l'ensemble des matrices testées, mais sa sensibilité (capacité de la méthode à donner un résultat positif lorsque l'échantillon est contaminé) n'est que de 83,8 % sur un caillé frais contaminé à 37,2 ufc de salmonelles par 25 g. En revanche, elle a une sensibilité de 99 % sur une poudre d'œuf contaminée à 115 ufc de salmonelles par 25 g. Le texte normatif de cette méthode de référence n'indique pas de sensibilité estimée sur une préparation en poudre pour nourrisson.

Une méthode alternative validée selon le protocole NF EN ISO 16140 (2003) ou de sa version révisée NF EN ISO 16140-2 (2016) fait notamment l'objet d'une caractérisation de sensibilité et de spécificité par comparaison à la méthode de référence ainsi que cela est rappelé dans la note de l'Anses du 19 avril 2018 (ANSES 2018). Pour être valide, la sensibilité de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence doit être proche de 100 %, ce qui signifie que la quasi-totalité des échantillons trouvés positifs par la méthode de référence doivent également être détectés comme positifs par la méthode alternative. Pour cette raison, il est couramment considéré qu'une méthode alternative validée a une sensibilité de 100 %. Il s'agit d'une approximation puisque la méthode de référence n'a pas elle-même une sensibilité réelle de 100 %.

Cette caractéristique de sensibilité de la méthode de référence ou alternative validée ne renseigne pas complètement sur la capacité de la méthode à détecter un très faible nombre d'ufc dans une masse déterminée de produit. Le calcul de la limite (ou niveau) de détection (LOD) des méthodes qualitatives permet quant à lui d'évaluer cette capacité.

La LOD<sub>50</sub> d'une méthode de recherche de pathogène correspond à la concentration en ufc dans une masse de produit définie qui est détectée dans 50 % des cas (et donc qui n'est pas détectée non plus dans 50 % des cas). La valeur de la LOD<sub>50</sub> est toujours assortie de son intervalle de confiance.

Les données fournies par le texte NF EN ISO 6579-1 indiquent que la LOD<sub>50</sub> de la méthode de référence sur du caillé frais est de 5,7 (4,0 à 8,1) ufc de salmonelles dans 25 g, de 6,0 (4,7 à 7,7) dans de la poudre d'œuf, de 2,2 (1,5 à 3,2) dans de la viande de volaille. Il est rappelé que ces estimations sont obtenues en contaminant des échantillons stériles à différents niveaux avec des souches cultivées. Ces protocoles

expérimentaux ne peuvent être totalement transposés à la capacité de détecter des souches de salmonelles issus de l'aliment ou de l'environnement qui ont subi un traitement thermique ou ont été stressées par une exposition à des désinfectants ou autres facteurs physico-chimiques, ou encore qui ont survécu à une longue période dans un milieu particulièrement sec. En d'autres termes, lors de l'utilisation de la méthode de référence sur des préparations en poudre ou sur des échantillons de l'environnement potentiellement naturellement contaminés, il peut y avoir une probabilité supérieure à 50 % de ne pas détecter la présence de cellules bactériennes dans une prise d'essai de 25 g si leur nombre est proche de cette LOD<sub>50</sub>.

Lors de l'établissement des dossiers de validation NF EN ISO 16140 ou NF EN ISO 16140-2, les valeurs de LOD<sub>50</sub> des méthodes alternatives candidates ou de la méthode de référence estimées étaient comprises entre 0,3 à 2 ufc de salmonelles par 25 g, soit une valeur moyenne de 1 environ dans 25 g de produit. Si ces résultats sont meilleurs que ceux fournis par la méthode de référence, il n'en reste pas moins que cette limite de détection spécifique à la méthode alternative a des conséquences en matière de détection d'un lot contaminé. De plus, ces estimations sont toujours obtenues dans des conditions expérimentales différentes de celles des échantillons prélevés en entreprise. Le protocole de la norme NF EN ISO 16140-2 indique dans son annexe C la possible prise en compte d'un stress thermique, mais uniquement à titre informatif et ce stress ne représente pas l'ensemble des stress subis par les souches susceptibles d'être présentes dans les préparations en poudre pour nourrissons. Il faut signaler en outre que seule une partie des LOD<sub>50</sub> des méthodes alternatives validées ont été estimées en utilisant des préparations en poudre pour nourrissons.

**Compte tenu de la criticité des incidents causés par des salmonelles dans des préparations en poudre pour nourrissons, tous les dossiers de validation de méthodes alternatives devraient contenir une estimation de LOD<sub>50</sub> réalisé à partir de ce type de produit.**

Pour illustrer l'incidence de cette limite de détection, si on considère par exemple un lot de produit contaminé de façon totalement uniforme (situation considérée comme non probable dans la réalité) à la concentration de 1,4 ufc par kg correspondant au seuil théorique défini pour les préparations en poudre pour nourrissons par le critère du Règlement (CE) n°2073/2005 modifié (non détecté dans 25 g, n=30, c=0) et que l'on considère une LOD<sub>50</sub> estimée égale à 1 ufc/25 g, un prélèvement de 25 g réalisé sur une boîte de 1 kg a une probabilité de  $1,4 \times 25/1000$  de contenir une ufc de salmonelles soit une probabilité de 3,5 %. Ce prélèvement de 25 g a donc une probabilité de 50 % x 3,5 % = 1,75 % d'être détecté comme positif. La probabilité de ne pas détecter une anomalie sur cette boîte de 1 kg faisant l'objet d'une seule prise d'essai de 25 g est donc de 98,25 %. Le contrôle analytique d'un échantillon de 30 prélèvements de ce type sur 30 boîtes prélevées tout au long de la production a donc une probabilité de  $0,9825^{30}$ , soit environ 59 %, de ne pas détecter une contamination.

Les éléments ci-dessus conduisent donc à constater qu'un résultat de recherche de salmonelle négatif sur une prise d'essai de 25 g est loin de garantir l'absence de la bactérie dans l'échantillon ni même dans la prise d'essai. Les données disponibles concernant la caractérisation des méthodes de détection des *Cronobacter* conduisent à des valeurs approximativement de même ordre soit des LOD<sub>50</sub> théoriques (en condition de laboratoire) de 1 ufc/10 g de préparations en poudre pour nourrissons, ces estimations étant obtenues à partir de préparations en poudre pour nourrissons, car il s'agit d'une analyse spécifique du secteur.

En conclusion, la LOD<sub>50</sub> a une forte incidence sur la probabilité de détecter un lot non conforme, lorsque la concentration de la bactérie pathogène est faible, l'efficacité du plan d'échantillonnage devient alors très « méthode dépendante ». En revanche, il apparaît que la probabilité de détecter une présence de salmonelles à un niveau plus élevé que la LOD<sub>50</sub> dans les produits étant plus grande, cela conduit donc à conclure que si la contamination est irrégulière avec des pics de présence au-delà de 2-4 ufc/25 g, ces pics seront détectés à la condition que le prélèvement soit réalisé là où ils surviennent. L'efficacité du plan d'échantillonnage est dans ce cas « répartition de contamination dépendante ».

Dans le précédent rapport, les performances des méthodes d'analyses ont été supposées parfaites (AFSSA 2008).

**Salmonella.** Les rapports de synthèse des études de validation des méthodes alternatives validées Afnor Certification, disponibles sur le site <https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/>, décrivent la performance des différentes méthodes alternatives jugées équivalentes à la méthode de référence, spécifiquement à l'agent pathogène recherché. La sensibilité de détection de *Salmonella* spp., notamment dans les poudres de lait a été évaluée pour chaque méthode culturale, comparativement à la méthode de référence NF EN ISO 6579-1:2017 (ou version antérieure selon l'année de validation de la méthode considérée), selon les modalités de validation décrites dans le cadre de la norme NF EN ISO 16140 (2003)

ou de la version révisée (NF EN ISO 16140-2 (2016)). Au regard des rapports disponibles à la date du 15 avril 2019, publiés sur le site de Afnor Certification entre 2015 et 2018, une **sensibilité moyenne des méthodes culturales égale à 90 %** a été retenue.

**Cronobacter.** La sensibilité de détection de *Cronobacter* spp. dans les poudres de lait a été évaluée pour les deux méthodes alternatives culturales validées (date de consultation du site le 22 mai 2019), comparativement à la méthode de référence NF EN ISO 22964:2017, selon les modalités de validation décrites dans le cadre de la norme EN ISO 16140 (2003) ou NF EN ISO 16140-2 (2016). Une **sensibilité de détection de Cronobacter égale à 90 %** a été retenue pour les calculs présentés dans ce rapport. Cette sensibilité correspond à la sensibilité la moins élevée des deux méthodes.

**Avertissement : les calculs de probabilité de détection d'un lot contaminé, présentés dans la suite du rapport, ont été réalisés par simplification à partir d'une sensibilité égale à 90 % sans tenir compte de l'incidence de la LOD.**

#### 3.4.3.3. Mode d'échantillonnage

Comme expliqué dans le paragraphe 3.4.3.1, la répartition temporelle de la contamination est considérée hétérogène ; par conséquent, un échantillonnage aléatoire (et non pas systématique) le long de la chaîne de production est préconisé. La stratégie de contrôle est caractérisée par deux paramètres :

- n : nombre de prises d'essai (taille de l'échantillon) ;
- m : masse de chaque prise d'essai (kg).

Ces paramètres sont définis dans le rapport de l'AFSSA (2008).

#### 3.4.3.4. Bilan sur les modalités du plan d'échantillonnage

Le plan d'échantillonnage proposé est soumis aux hypothèses suivantes :

- la masse de produit est élaborée à vitesse constante ;
- la position de la(es) partie(s) contaminée(s) est(sont) supposée(s) aléatoire(s) dans le lot ;
- le prélèvement est réalisé en fin de production (c'est-à-dire sur le produit fini avant stockage). Cela correspond à un plan de contrôle de routine et devrait être révisé dans le cas d'une recherche de cause de contamination ;
- toutes les prises d'essai ont la même masse ;
- si les prises d'essai sont mélangées avant analyse, on suppose que le mélange résultant est homogène ;
- si les prises d'essai sont mélangées, on suppose qu'il n'y a pas d'enrichissement des prélèvements avant regroupement ;
- la spécificité du test microbiologique est supposée égale à 100 % ;
- la sensibilité<sup>7</sup> du test microbiologique est supposée égale à 90 % ;
- il n'est pas tenu compte des résultats relatifs aux lots précédents (c'est-à-dire, pour l'étude de plusieurs lots, on suppose que tous les lots ont les mêmes caractéristiques microbiologiques) ;
- il n'est pas tenu compte de la LOD<sub>50</sub>.

<sup>7</sup> Dans le présent calcul des performances d'échantillonnage, la sensibilité est interprétée comme la probabilité qu'une cellule de salmonelle présente dans la prise d'essai soit détectée.

### 3.4.4. Calculs associés au plan d'échantillonnage du produit fini

#### 3.4.4.1. Loïs de probabilité

Le plan d'échantillonnage se base sur les six paramètres précédemment définis :

- M : masse du lot (kg) ;
- $\mu$  : densité de contamination (moyenne) du lot (ufc/kg) ;
- s : hétérogénéité spatiale de la contamination ;
- Se : sensibilité de la méthode d'analyse ;
- n : nombre de prises d'essai ;
- m : masse de chaque prise d'essai (kg).

La contamination est caractérisée par sa densité de contamination ( $\mu$ ) et par sa dispersion (s). Cette contamination peut donc être décrite par :

- une loi négative binomiale de paramètres «  $\mu$  » et « s » lorsque les bactéries sont réparties de façon hétérogène dans l'espace (Jongenburger, Bassett, *et al.* 2012, Jongenburger, Reij, *et al.* 2012) ;
- une loi de Poisson de paramètre «  $\mu$  » lorsque les bactéries sont réparties de façon homogène dans l'espace (Habraken, Mossel, et van den Reek 1986, Valero *et al.* 2014).

Lorsque le paramètre « s » tend vers l'infini (par ex. 1 000), la loi négative binomiale donne des résultats très proches que ceux obtenus avec la loi de Poisson, utilisée pour le calcul de la probabilité de détection dans le rapport de l'AFSSA (2008) où l'homogénéité spatiale était supposée. Le cas où la répartition spatiale des bactéries est homogène (« s » tend vers l'infini) est donc un cas particulier.

#### 3.4.4.2. Aide à la définition de valeurs cibles de la densité de contamination

Pour déterminer de façon réaliste les valeurs cibles de densité de contamination «  $\mu$  », nous nous plaçons dans le cas où la probabilité de tomber malade en consommant les poudres issues de tout le lot est inférieure à 1 (ceci revient à un nombre de cas attendus, à la suite de la consommation d'un lot contaminé, inférieur à 1). Les calculs suivants sont donc appliqués pour différentes valeurs de «  $\mu$  » ; celles associées à une probabilité de tomber malade faible seront retenues.

On suppose ici que tout le contenu de la boîte de masse «  $m_b$  » est analysé. La prévalence «  $\pi$  » est la proportion de boîtes contaminées. Elle est équivalente à la probabilité qu'il y ait au moins une bactérie dans une boîte tirée au sort du même lot.

- Si les bactéries sont réparties de façon hétérogène (c'est-à-dire que la contamination est décrite par une loi négative binomiale) :

$$\pi = P(X > 0) = 1 - P(X = 0) = 1 - \left(\frac{s}{s + \mu \cdot m_b}\right)^s$$

- Si les bactéries sont réparties de façon homogène (c'est-à-dire que la contamination est décrite par une loi de Poisson, pouvant être vu comme un cas particulier de la loi binomiale négative) :

$$\pi = P(X > 0) = 1 - P(X = 0) = 1 - e^{-\mu \cdot m_b}$$

La concentration moyenne dans les boîtes contaminées du lot ( $\mu_c$  en ufc/kg), peut alors être déduite de la densité de contamination «  $\mu$  » et de la prévalence «  $\pi$  » :

$$\mu_c = \frac{\mu}{\pi}$$

En considérant une relation dose/réponse exponentielle de paramètre « r » égal à  $2,14 \cdot 10^{-3}$  pour *Salmonella* (FAO/WHO 2002), il est possible de calculer la probabilité moyenne de tomber malade en consommant un nombre de boîtes K, chaque boîte ayant une masse «  $m_b$  », en appliquant la formule suivante pour K = 1 :

$$P(\text{malades}, K = 1) = 1 - \left(1 + \frac{r \cdot \mu \cdot m_b}{s}\right)^{-s}$$



### 3.4.4.3. Nombre de prises d'essai à prélever pour déterminer le statut d'un lot

L'objectif est de caractériser un lot, c'est-à-dire à connaître avec un niveau de confiance de 95%, son statut « contaminé » (au moins une prise d'essai est détectée positive). Il est considéré, à titre d'exemple, qu'un prélèvement automatisé sur la ligne de fabrication est réalisé et que les prises d'essai ont une masse « m » (égale à 10 ou 25 g). Il est possible de calculer le nombre d'unités « n » de masse « m » à prélever pour observer au moins une unité non conforme :

- Si les bactéries sont réparties de façon hétérogène (c'est-à-dire que la contamination est décrite par une loi négative binomiale) :

$$n = \frac{\log(0.05)}{s \cdot \log\left(\frac{s}{s + s \cdot \mu \cdot m}\right)}$$

- Si les bactéries sont réparties de façon homogène (c'est-à-dire que la contamination est décrite par une loi de Poisson, pouvant être vu comme un cas particulier de la loi binomiale négative) :

$$n = \frac{\log(0.05)}{-s \cdot \mu \cdot m}$$

### 3.4.5. Exemple de plan d'échantillonnage du produit fini

L'objectif est d'illustrer au moyen d'un exemple les valeurs plausibles, ainsi que leur variabilité possible. Nous nous plaçons dans le cas d'un lot de 20 tonnes (M), ce qui correspond à 25 000 boîtes de  $m_b = 0,8$  kg. Nous choisissons de faire varier deux paramètres : la densité de contamination ( $\mu$ , ufc/kg) et l'hétérogénéité spatiale de la contamination (s, de  $s=0,0001$  (hétérogène) à  $s \sim 1000$  (homogène)). La sensibilité du test analytique est de 90 %. Le plan d'échantillonnage, pour des prises d'essai de 0,025 kg, a pour objectif de détecter le statut du lot (c'est-à-dire contaminé ou non) avec un niveau de confiance de 95 %. Les résultats sont donnés dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Impact de la densité ( $\mu$ , ufc/kg) et de l'hétérogénéité spatiale de la contamination (de  $s=0,0001$  (hétérogène) à  $s\sim 1000$  (homogène)) sur la prévalence de contamination ( $\pi$ , %), la concentration dans la partie contaminée ( $\mu_c$ , ufc/kg) et le risque (pour 1 boîte, pour le lot) pour *Salmonella*; cas d'un lot de 20 t; échantillonnage associé (prises d'essai de 0,025 kg) pour détecter le statut de ce lot à 95 %\*.

Caractéristiques de la contamination en salmonelles				Risque		Echantillonnage
Densité de la contamination (ufc/kg)	Hétérogénéité spatiale (s)	Prévalence (%)	Concentration dans la partie contaminée (ufc/kg)	Nombre de cas attendus (1 boîte)	Nombre de cas attendus (lot)	Nombre de prises d'essai (0,025 kg)
0,01	0,0001	0,04	23,31	1,43E-05	0,36	25417
0,01	0,001	0,21	4,76	1,53E-05	0,38	14762
0,01	0,01	0,54	1,85	1,54E-05	0,38	13464
0,01	0,1	0,69	1,44	1,54E-05	0,39	13329
0,01	1	0,71	1,40	1,54E-05	0,39	13316
0,01	1000 (homogène)	0,72	1,39	1,54E-05	0,39	13314
0,1	0,0001	0,07	152,01	9,32E-05	2	9489
0,1	0,001	0,43	23,36	1,43E-04	4	2542
0,1	0,01	2,08	4,80	1,53E-04	4	1476
0,1	0,1	5,28	1,89	1,54E-04	4	1346
0,1	1	6,72	1,49	1,54E-04	4	1333
0,1	1000 (homogène)	6,95	1,44	1,54E-04	4	1331
1	0,0001	0,09	1126,38	2,80E-04	7	5527
1	0,001	0,66	152,46	9,32E-04	23	949
1	0,01	4,20	23,81	1,43E-03	36	254
1	0,1	18,98	5,27	1,53E-03	38	148
1	1	41,86	2,39	1,54E-03	38	135
1	1000 (homogène)	51,31	1,95	1,54E-03	38	133
10	0,0001	0,11	8946,00	5,04E-04	13	3881
10	0,001	0,88	1130,88	2,79E-03	70	553
10	0,01	6,37	157,02	9,28E-03	232	95
10	0,1	34,89	28,66	1,42E-02	356	25
10	1	87,80	11,39	1,52E-02	379	15
10	1000 (homogène)	99,92	10,01	1,53E-02	382	13
100	0,0001	0,13	74195,44	7,34E-04	18	2989
100	0,001	1,11	8991,09	5,03E-03	126	388
100	0,01	8,50	1176,62	2,76E-02	690	55
100	0,1	48,21	207,41	8,90E-02	2226	9
100	1	98,63	101,39	1,34E-01	3338	3
100	1000 (homogène)	100,00	100,00	1,43E-01	3570	1

\*Ce tableau est donné à titre d'exemple pour illustrer les limites de l'échantillonnage sur produit fini.

D'après les résultats du tableau 5, si l'on se place dans le cas où le risque de contamination du lot est faible (c'est-à-dire que le nombre de cas attendus par lot est inférieur à 1), il s'ensuit que :

- la densité de contamination et la prévalence sont très faibles (respectivement  $\mu = 0,01$  ufc/kg et «  $\pi$  » comprise en 0,04 % et 0,72 % selon l'hétérogénéité spatiale de la contamination) ;
- le nombre de prises d'essai pour déterminer le statut contaminé de ce lot est très élevé (et donc irréaliste en pratique). Il faudrait prélever entre 13 314 et 25 417 prises d'essai de 0,025 kg.

Si l'on se place dans le cas où le risque de contamination du lot est assez élevé (par ex. le nombre de cas attendus par lot est compris entre 7 et 38), il s'ensuit que :

- la densité de contamination et la prévalence sont moyennes (respectivement  $\mu=1$  ufc/kg et «  $\pi$  » comprise en 0,09 % et 51 % selon l'hétérogénéité spatiale de la contamination) ;
- le nombre de prises d'essai pour déterminer le statut contaminé de ce lot reste assez élevé. Il faudrait prélever entre 133 et 5527 prises d'essai de 0,025 kg.

#### 3.4.6. Bilan sur le plan d'échantillonnage du produit fini

Lorsque la contamination d'un lot est très faible (c'est-à-dire la situation qui correspond à un nombre de cas attendus par lot inférieur à 1), il n'est pas réaliste de mettre en place un plan d'échantillonnage pour déterminer le statut contaminé d'un lot.

Lorsque la contamination d'un lot est plus élevée (par ex. une situation correspondant à un nombre de cas attendu par lot compris entre 7 et 38), il reste malgré tout difficile de mettre en place un plan d'échantillonnage pour déterminer le statut contaminé d'un lot.

**Ce qui précède montre que seuls les lots très contaminés peuvent être détectés par un échantillonnage comportant moins d'une centaine de prises d'essai. On voit donc ici toute la limite des plans d'échantillonnage du produit fini : la puissance des tests statistiques et la performance des méthodes analytiques ne sont pas suffisantes pour considérer que l'échantillonnage du produit fini est une mesure de maîtrise.**

### 3.5. Prévention et surveillance de la contamination environnementale

#### 3.5.1. Objectifs et stratégie de mise en place

Comme rappelé ci-dessus, l'échantillonnage du produit fini a ses limites liées notamment au manque de puissance des tests statistiques en cas de faible contamination (sachant qu'il est impossible de se passer d'échantillonnage puisqu'on ne peut pas analyser le lot dans son intégralité). C'est donc seulement en mettant en œuvre des actions préventives contre les contaminations que la santé publique peut être protégée. Comme ces dernières proviennent de l'environnement de fabrication, l'échantillonnage de celui-ci est essentiel. Il permet de :

- détecter une contamination de l'environnement par **un agent pathogène** ; une présence dans l'environnement devrait alerter sur un risque de contamination du produit fini. De ce point de vue, l'échantillonnage dans l'environnement contribue à prévenir une éventuelle contamination du produit fini (ICMSF 2002a, 2018).
- établir un **niveau de référence des indicateurs d'hygiène** (exprimé sous forme « détection/non détection » ou densité) acceptable en-dessous duquel l'hygiène de l'environnement est considérée comme maîtrisée, et au-delà duquel des actions correctives sont nécessaires. La recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* sont rapides, peu coûteux, faciles à mettre en œuvre. Échantillonner et analyser intensivement pendant six mois, lorsqu'il est considéré de façon responsable que l'usine fonctionne dans les conditions hygiéniques optimales, permet d'établir les niveaux de référence des *Enterobacteriaceae*. Ensuite, en période d'échantillonnage régulier de routine (hors recherche associée à une contamination du produit fini par un agent pathogène), tout écart significatif (par ex., dix fois au-dessus du niveau de référence) constitue une cause particulière d'actions correctives. L'équipe chargée des analyses au sein de l'usine devrait prendre en considération des

variables telles que la saisonnalité, la localisation géographique et les sources d'approvisionnement, qui peuvent impacter le niveau de référence.

- évaluer si ce niveau de référence est dépassé ou non ;
- rechercher une source de contamination d'une bactérie pathogène, quand il y a eu p. ex. des échantillons positifs dans le produit fini, afin d'appliquer les actions correctives adéquates. Dans ce cas, il est important d'assembler et d'examiner les données historiques d'échantillonnage de l'environnement qui peuvent révéler des tendances ou suggérer une tendance particulière. Pour cet objectif, l'utilisation de données analytiques de caractérisation des souches peut également être très informative. De même l'analyse des transferts potentiels de contaminations au sein de l'usine par l'établissement de cartographie est un outil à privilégier (cf. section 3.5.2).

La stratégie d'échantillonnage dans l'ensemble de l'environnement de l'usine ne sera pas identique partout. À titre d'exemple, le groupe de travail recommande les modalités d'échantillonnage suivantes :

- **sur les surfaces en contact avec le produit (hors situation de crise lors de la recherche d'une source de contamination), l'échantillonnage vise le repérage des *Enterobacteriaceae***, en effet il y a très peu de chance de détecter *Salmonella* ou *Cronobacter*. L'échantillonnage peut être effectué avant l'ouverture de la ligne de production, avant la désinfection et avant démarrage ou relance d'une ligne de production. L'échantillonnage après le nettoyage, mais avant l'application du désinfectant est une bonne mesure de l'efficacité du nettoyage. L'analyse de l'environnement par échantillonnage joue ici pleinement son rôle dans la **vérification** des mesures de maîtrise.
- les surfaces plus éloignées du produit (ex. surface extérieure d'un équipement) et très éloignées (ex. les murs) peuvent **être échantillonnées pour *Salmonella*, *Cronobacter* et *Enterobacteriaceae*** tout au long du cycle de production (par ex. juste après le démarrage, trois ou quatre heures après le démarrage et à la fin du cycle de production). Une partie des lieux et des moments de prélèvement devraient être changés d'une semaine sur l'autre.
- les aires extérieures, adjacentes, de passage (les vestiaires, les quais de chargement, les entrepôts, les cafétérias, les salles de pause) devraient **être échantillonnées pour *Salmonella***. Les vestiaires des employés, non correctement nettoyés et entretenus, se sont avérés des points d'accumulation de *Salmonella* (ABC s.d.), les camions de livraison également.

Lorsqu'une tendance ou d'autres renseignements indiquent un risque de contamination, la raison devrait en être déterminée. Cela implique la combinaison d'un échantillonnage accru et ciblé, la collecte des données nécessaires à l'identification de la source de contamination, et la mise en œuvre d'actions correctives. Un exemple de fréquence d'échantillonnage en situation renforcée (détection repérée) par rapport à la situation de routine est présenté dans le tableau 6 (ICMSF 2018).

**Tableau 6.** Exemple de fréquence d'échantillonnage en situation renforcée (détection repérée) par rapport à la situation de routine (ICMSF 2018)

Type de prélèvement	Lieu de prélèvement	Fréquence en situation de routine	Fréquence en situation renforcée
Aire	Aire près de la tour de séchage	1 fois par semaine	Plusieurs prélèvements par semaine*
	Aire en sortie de la tour de séchage	1 fois par semaine	Plusieurs prélèvements par semaine*
	Aire de stockage avant conditionnement	1 fois par semaine	Plusieurs prélèvements par semaine*
	Aire de packaging	1 fois par semaine	Plusieurs prélèvements par semaine*
Matériel/Machine/Produit intermédiaire	Robinet d'approvisionnement en eau	1 fois par semaine	1 fois par jour
	Filtres à air	1 fois par mois	Plusieurs prélèvements par semaine*
	Dépôts dans les cyclones	1 fois par semaine	1 fois par jour
	Tamis / lit fluidisé	1 fois par jour	Plusieurs prélèvements par jour*
	Produit intermédiaire avant conditionnement	1 fois par semaine	1 fois par jour
	Matériel de conditionnement	En début de production	Plusieurs prélèvements par semaine*

\* les prélèvements seront réalisés au même endroit ou à des endroits différents selon l'état de l'analyse de la cause de la contamination.

Enfin, et même si ceci est à distinguer d'un plan de surveillance, l'échantillonnage de l'environnement, comme l'échantillonnage des matières premières, peuvent être utilisés pour la **validation** des mesures de maîtrise, puisqu'ils fournissent des informations sur les contaminations de base et permettent d'établir des suivis de tendance. En effet, leur analyse adossée à des études spécifiques, à la littérature, aux modèles prévisionnels, permettent de déterminer si les mesures de maîtrise mises en place (pour assurer la réduction, éviter la recontamination, limiter la croissance) sont suffisantes (Zwietering *et al.* 2016). L'analyse de prélèvements environnementaux suivant un plan d'échantillonnage pertinent permettra donc de revalider des mesures de maîtrise si à la suite d'une contamination, il a été nécessaire de les modifier.

### 3.5.2. Cartographie des voies de contamination d'un site de production et diagramme de causalité

#### 3.5.2.1. Établissement d'une cartographie des voies de contamination

La cartographie des voies de transmission des contaminants microbiologiques est un outil utile pour étudier la contamination par des agents pathogènes des préparations en poudre pour nourrissons. Elle peut être due à une suite d'événements de transferts de poussières contaminées provenant de l'environnement de l'usine. Ces poussières sont principalement de la poudre s'échappant sous forme d'aérosol de la tour, des cyclones, du lit fluidisé, du tapis convoyeur, etc. Elles peuvent se déposer sur des surfaces contaminées par des agents pathogènes. Ces poussières, très fines, sont dispersées par le moindre mouvement d'air et contribuent à la dispersion des agents pathogènes qui peuvent trouver abri, s'accumuler et survivre dans des anfractuosités, fissures, joints usés et recoins divers et se multiplier dans les emplacements humides (p.ex. près des points d'eau). Dans la suite pour simplifier, nous ne parlerons que de « points d'accumulation ».

Les transferts de poussières sont liés au fonctionnement de l'usine, aux interventions des opérateurs lors des opérations de maintenance et de nettoyage, aux nuisibles ou au transport par les mouvements d'air. L'enjeu pour éviter la contamination des produits est d'éviter d'une part, les transferts de poussières par la mise en place de mesures de maîtrise et d'autre part, les points d'accumulation potentiels.

L'objectif de cette partie est de présenter une méthode de cartographie des voies de transmission pour l'étude des transferts des poussières dans l'environnement d'une usine générique de production de préparations en poudre pour nourrissons. Cette méthode permet d'identifier et de lister les transferts possibles afin de mettre en place des mesures de maîtrise appropriées. Elle permet aussi d'identifier les causes possibles d'un événement anormal (détection de pathogène, niveau élevé des indicateurs d'hygiène par rapport à un niveau de référence). Il est important de rappeler que l'exemple montré ici est générique. Les transferts présentés ne sont pas exhaustifs et ne représentent pas l'ensemble des pratiques et des procédés que l'on peut rencontrer dans les usines. Seules les principales étapes d'une production sont présentées (stockage, mélange, concentration, traitement thermique, séchage par pulvérisation dans l'air chaud, flottation sur lit fluidisé et conditionnement). Pour utiliser la méthode présentée ici, il est donc nécessaire de l'adapter aux spécificités de chaque usine.

Les zones de niveau d'hygiène différent (hygiène de base, hygiène intermédiaire, haute hygiène, très haute hygiène) décrites dans les PMS des usines sont indiquées dans les figures ainsi que les transferts liés aux flux des matières premières et de matériels de conditionnement, aux opérateurs et aux transferts par l'air. La cartographie reprend également le principe de classement des surfaces en fonction de leur proximité avec les produits (contact direct, proche sans contact, éloignée).

#### ▪ Flux des matières premières, des produits et des matériaux et de conditionnement

La figure 5 montre les flux des matières premières, des produits et des matériels de conditionnement dans l'environnement de l'usine. Les emballages peuvent être une source de contamination des produits lors du conditionnement (flèche pointillée rouge n°1). Ce transfert peut par exemple être limité par la désinfection des boîtes par traitement UV. Pour les sacs et big bags, qui ne font pas l'objet de traitement avant la phase de conditionnement, des suremballages de protection peuvent être utilisés lors de leur stockage afin de prévenir leur contamination. Des points d'accumulation de poussières peuvent être présents sur les surfaces extérieures des équipements tels que le lit fluidisé.

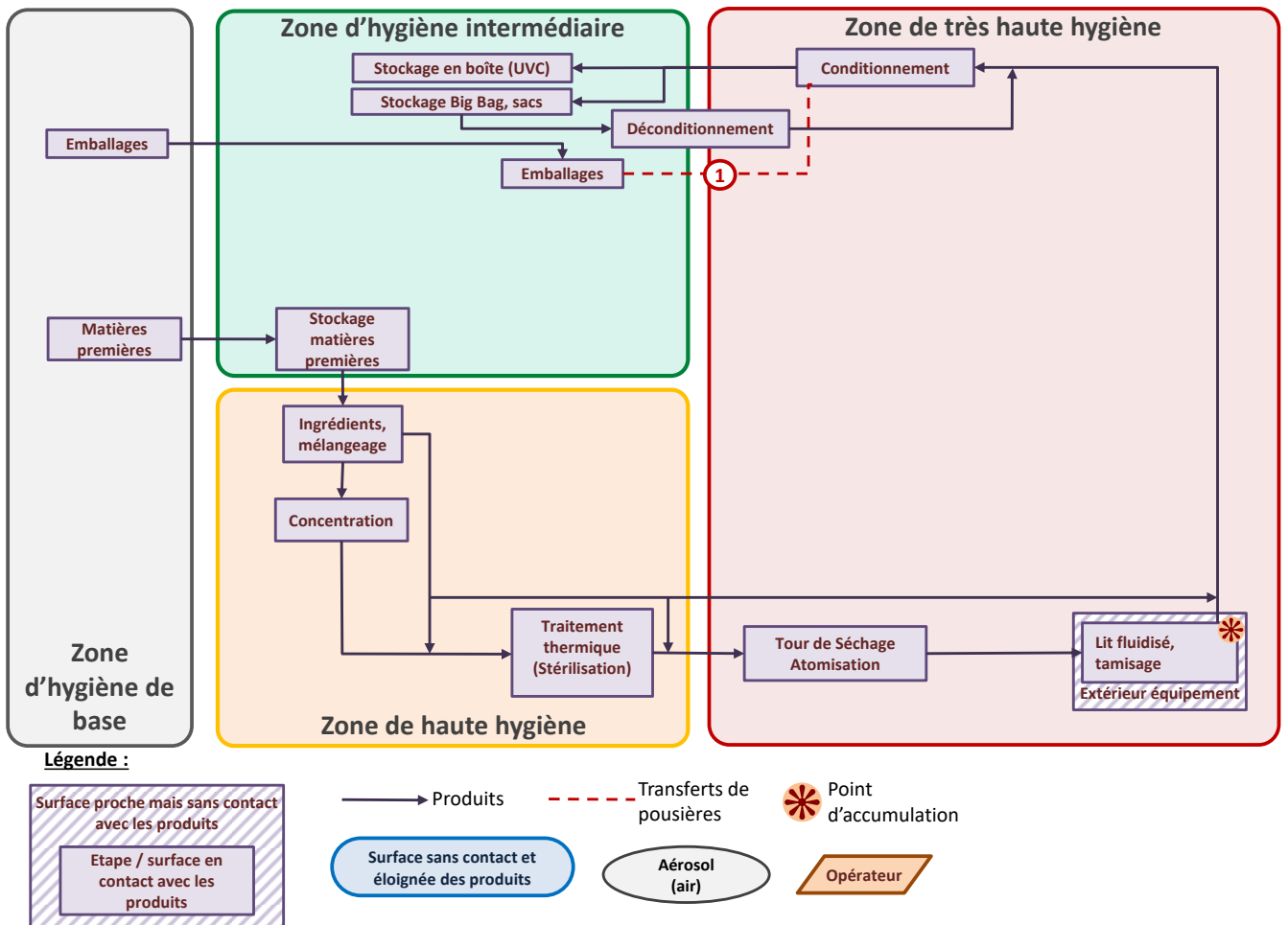


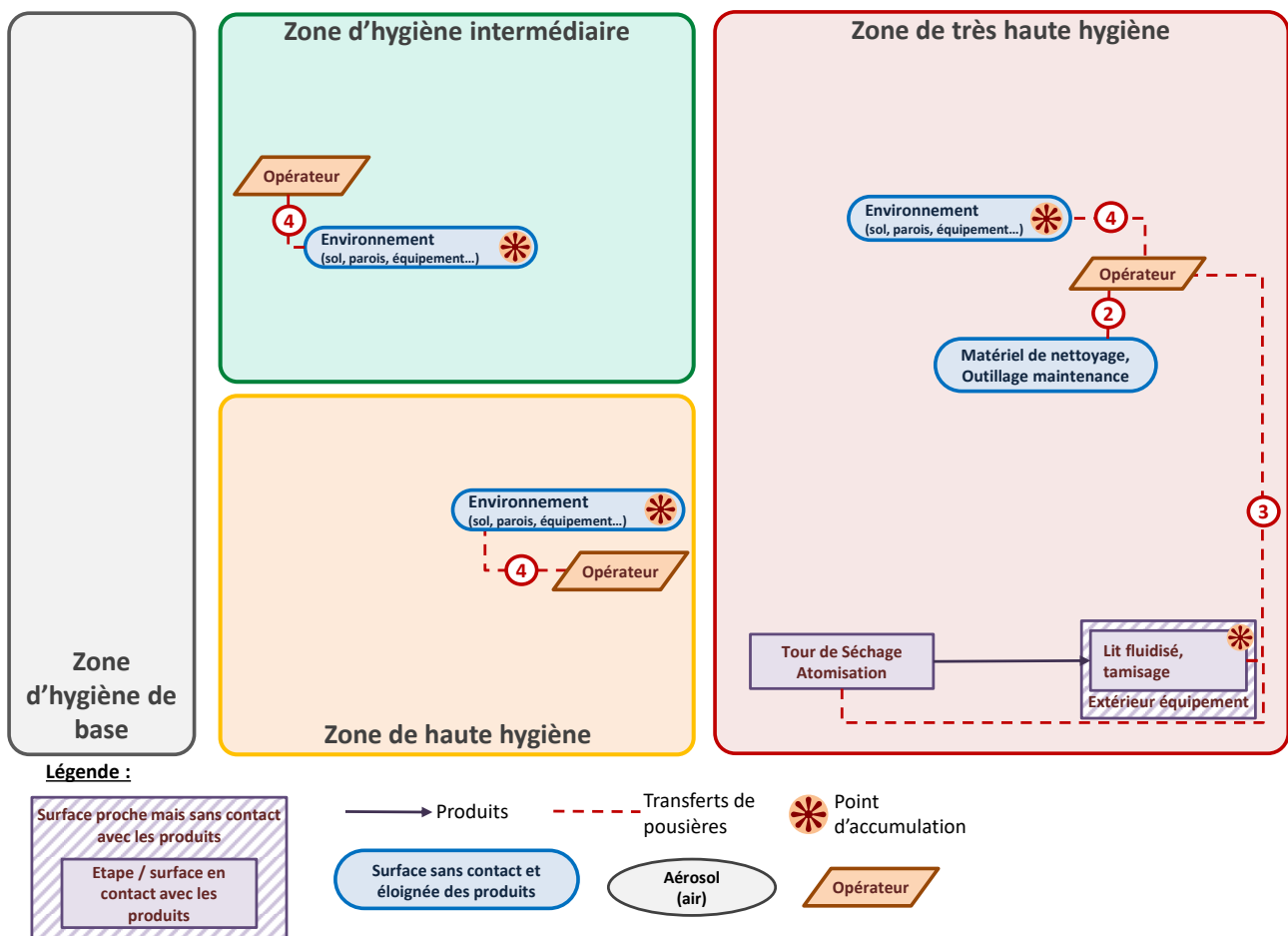
Figure 5. Flux des matières premières, des produits et des matériaux de conditionnement

▪ **Transferts liés aux opérateurs**

Les transferts des poussières peuvent se produire *via* les opérateurs intervenant dans la production, le nettoyage ou la maintenance. Trois types de transfert ont été identifiés et représentés par les pointillés rouges numérotés sur la figure 6 :

- n° 2 : transfert entre l'opérateur, le matériel de nettoyage ou l'outillage de maintenance ;
- n° 3 : transfert entre l'opérateur et les équipements (tour de séchage, lit fluidisé) lors des opérations de maintenance et nettoyage ;
- n° 4 : transfert entre l'opérateur et les surfaces sans contact direct avec les produits (parois, murs, transpalette, etc.).

Les transferts de poussières par les opérateurs lors des changements de secteur n'apparaissent pas sur cette cartographie. Pour limiter ces transferts, il est recommandé aux opérateurs de changer de tenue ou de revêtir une sur-tenue propre à chaque niveau d'hygiène. Un code couleur est recommandé pour identifier les tenues associées à chaque secteur. Le changement de tenue s'effectue dans les sas.



**Figure 6.** Transferts liés aux opérateurs

▪ **Transferts liés aux flux d'air**

Comme expliqué précédemment, les mouvements d'air peuvent transporter des particules suffisamment fines et les déposer sur d'autres surfaces de l'environnement de l'usine en contact direct ou non avec les produits, ou dans une zone de niveau d'hygiène différents. Ces transferts sont présentés dans la figure 7 :

- n° 5 : transfert entre l'air et les surfaces des équipements en contact direct avec les produits, ces transferts peuvent se produire si l'équipement n'est pas protégé par une barrière physique ;
- n° 6 : transfert entre l'air et les surfaces sans contact et éloignées des produits ;
- n° 7 : transfert entre l'air ambiant de deux zones de niveaux d'hygiène différents. Pour gérer les flux d'air, il est important que les zones les plus sensibles soient en surpression par rapport aux zones les moins sensibles (p.ex. zone de très haute hygiène en surpression par rapport à la zone de haute hygiène). Il est conseillé de filtrer l'air neuf entrant en fonction des exigences propres à chaque niveau d'hygiène (l'air neuf n'est pas inclus dans cette cartographie).

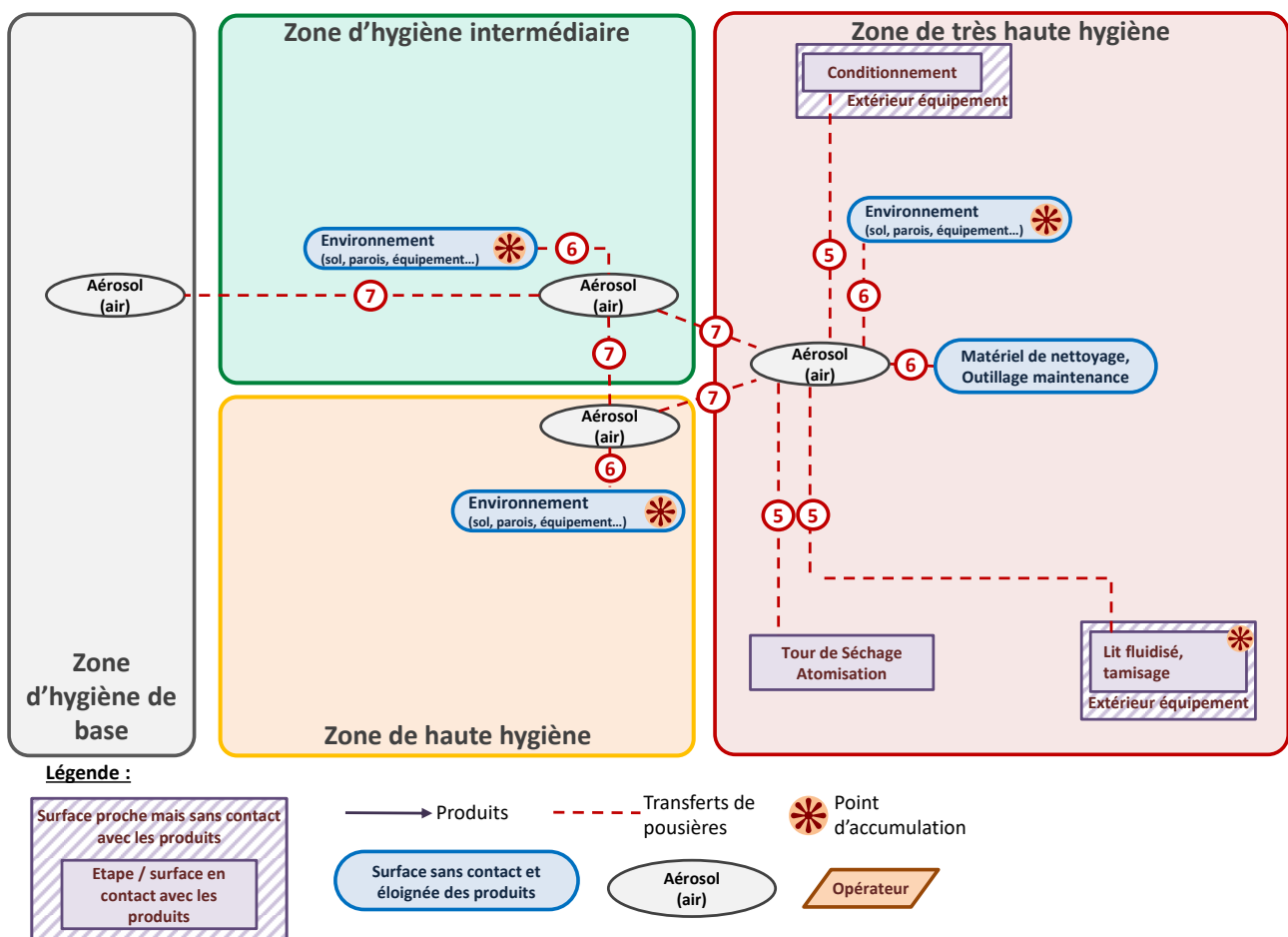


Figure 7. Transferts liés aux flux d'air



▪ **Autres transferts**

D'autres types de transferts peuvent se produire (Figure 8) :

- n° 8 : transfert entre le matériel de nettoyage ou de maintenance et les surfaces ;
- n° 9 : transfert entre l'environnement et l'emballage ;
- n° 10 : transfert entre l'environnement et le matériel de nettoyage / maintenance.

La dispersion des poussières dans l'environnement de l'usine par les nuisibles n'est pas décrite dans cet exemple de cartographie.

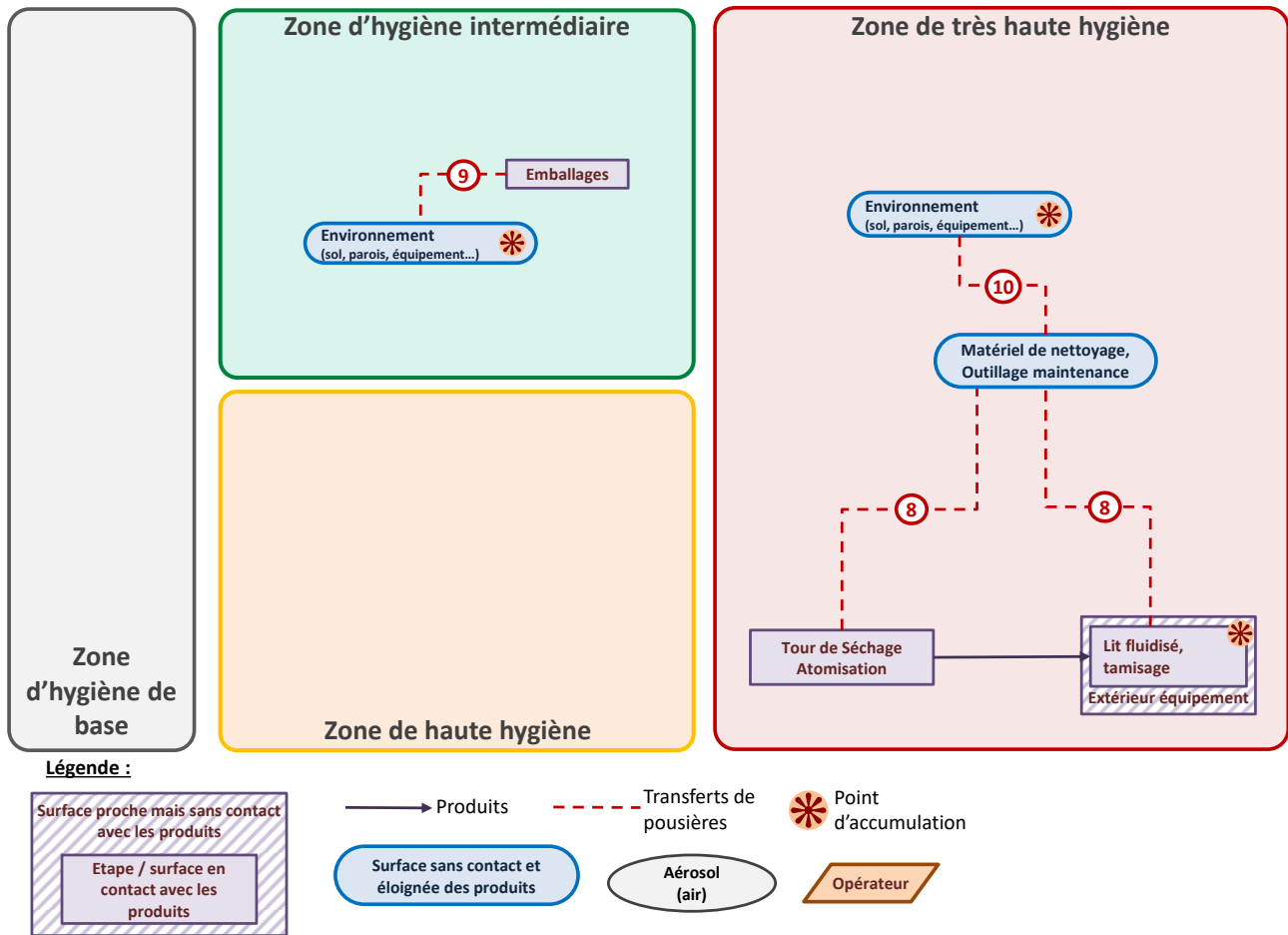


Figure 8. Autres transferts

▪ Synthèse des transferts

La figure 9 présente l'ensemble des transferts listés dans cette partie et montre la complexité des mécanismes de transfert dans un environnement de production de préparations en poudre pour nourrissons. Afin de limiter au maximum la propagation des agents pathogènes dans l'environnement, il est nécessaire d'identifier ces transferts potentiels et de mettre en place des mesures de maîtrise afin de les éliminer. Pour identifier les transferts et bâtir la cartographie (p. ex : liens entre différentes zones, entre différentes surfaces de l'environnement au sein d'une zone, entre une surface et les produits), l'utilisateur peut s'appuyer sur l'analyse des données de dénombrement des micro-organismes indicateurs d'hygiène.

La mise en place de ce type de cartographie sera également utile lors de la recherche des causes possibles de contamination si un pathogène est détecté dans le produit fini ou si un niveau anormalement élevé des indicateurs d'hygiène est observé sur une surface ou dans les produits. Elle sera utilisée en complément des diagrammes de causalité présentés dans la section suivante.

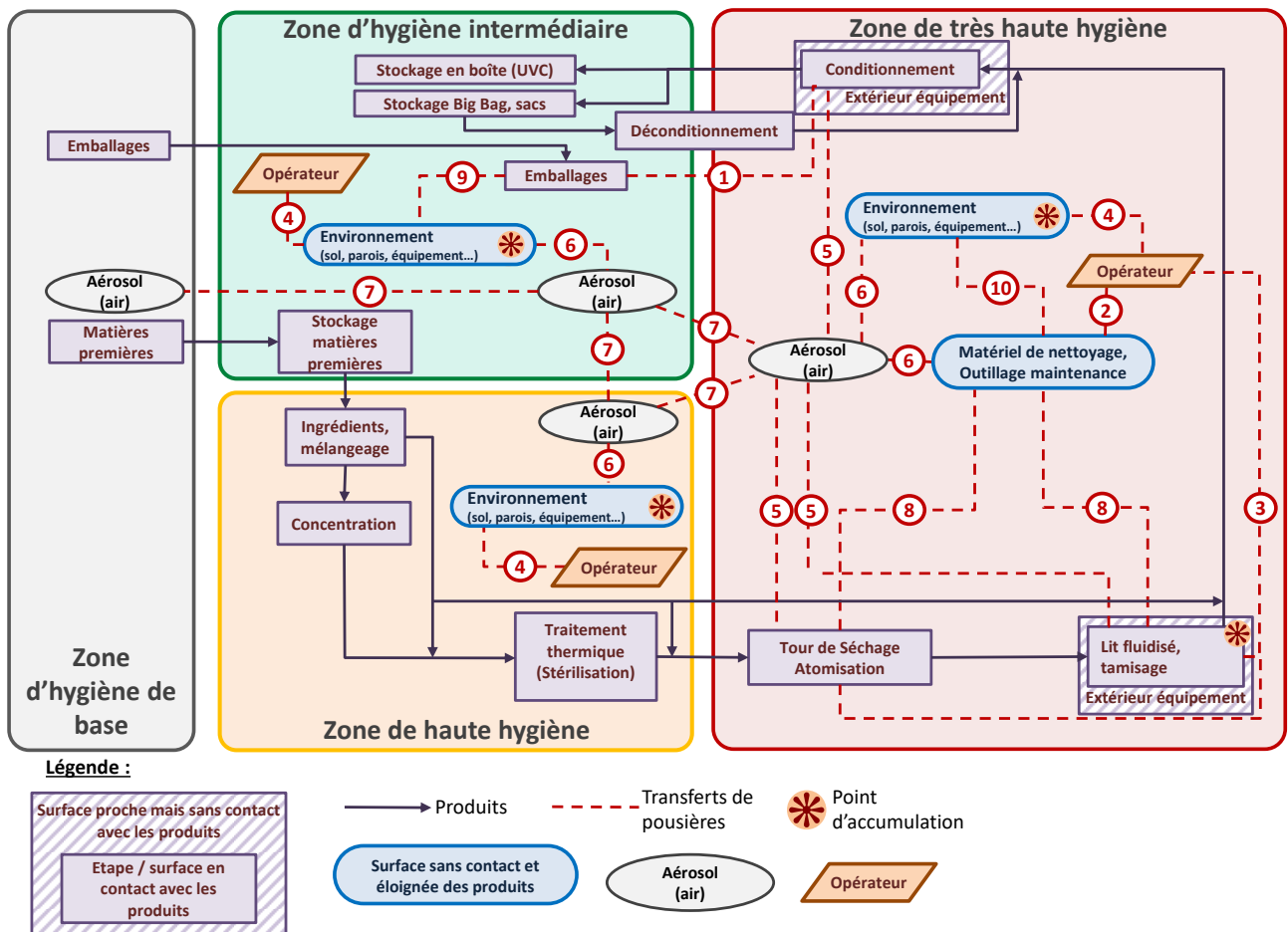


Figure 9. Synthèse des transferts de contamination dans un environnement de production de préparations en poudre pour nourrissons

### 3.5.2.2. Diagramme de causalité

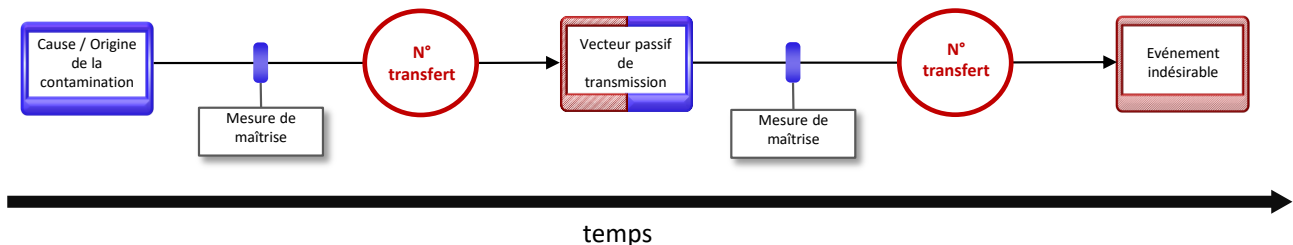
#### ▪ Principes

La cartographie des voies de transmission montre la complexité des transferts de poussières favorisant la propagation des pathogènes dans l'environnement de l'usine et pouvant conduire à la contamination des produits. Ainsi, même avec les mesures de maîtrise les plus strictes, il est nécessaire lorsqu'un événement indésirable est observé (présence de pathogène, niveau anormal des indicateurs d'hygiène), d'identifier sa cause.

L'objectif de cette partie est de proposer une méthodologie de recherche de causes à l'origine d'un effet indésirable. La méthode proposée est liée à la cartographie présentée dans la section précédente. Elle présente comme principal avantage de fournir un diagramme synthétique des séquences d'événements susceptibles au cours du temps d'aboutir à un effet indésirable. Ce diagramme de causalité permet également de visualiser les mesures de maîtrise mises en place. D'autres méthodes peuvent être utilisées (p. ex : nœud papillon (Iddir 2015)).

Le diagramme de causalité est composé de cinq éléments présentés dans la figure 10 :

- l'origine de la contamination ;
- les transferts (illustrée par les numéros de la cartographie) ;
- les mesures de maîtrise ;
- les vecteurs passifs de transmission qui servent d'intermédiaires entre l'origine de la contamination et l'événement indésirable. Par exemple, un outil peut être contaminé de manière récurrente par un opérateur et contaminer à son tour un équipement, la désinfection ou le changement de cet outil n'éliminera pas l'origine de la contamination ;
- l'événement indésirable : présence de pathogène, niveau anormalement élevé des indicateurs d'hygiène par rapport à un niveau de référence.



**Figure 10.** Définition des éléments du diagramme de causalité (rectangle bleu : la cause ; rectangle rouge : la conséquence)

#### ▪ Exemple

L'exemple décrit dans cette partie se base sur la cartographie et ne se veut pas exhaustif. Il a pour but de présenter la méthodologie. Ainsi, tous les vecteurs de transmission ou les mesures de maîtrise ne sont pas listés. Il est nécessaire d'adapter la méthodologie à chaque situation.

Dans l'exemple présenté dans la figure 11, un événement indésirable (p. ex. détection de pathogène, niveau des indicateurs d'hygiène anormalement élevé par rapport à un niveau de référence) a été observé sur une surface en contact avec les produits, synonyme d'une perte de maîtrise. L'objectif est de déterminer la cause de cet événement indésirable. La cartographie (Figure 9) permet d'identifier trois types de transferts pouvant conduire à la contamination d'une surface en contact avec les produits :

- transfert par aérosol (n° 5) ;
- transfert par l'outillage (n° 8) ;
- transfert par contact direct avec l'opérateur (n° 3).

Dans le cas présenté ici, on suppose que la surface où l'événement indésirable a été observé est protégée de façon à éviter le dépôt de poussières via l'aérosol, rendant le transfert n°5 peu probable. La recherche de cause se porte alors sur les deux autres types de transferts identifiés.

Si une intervention de maintenance a récemment été effectuée, un échantillonnage renforcé de l'outillage utilisé à cet effet sera mis en place. Dans le cas contraire, l'origine la plus probable de la contamination est un opérateur ayant été en contact direct avec la surface où l'effet indésirable a été observé. Il est alors nécessaire de vérifier la bonne application des mesures de maîtrise mises en place pour éliminer le transfert n° 3 (par ex. formation des opérateurs, lavage des mains, tenues spécifiques à chaque secteur) et d'être vigilant quant à la récurrence de l'effet indésirable. Si une récurrence de l'effet indésirable est observée, on peut soit admettre que la bonne application des mesures associées au potentiel transfert n° 3 n'est pas en place et y remédier, soit, et ceci est plus probable, reconsidérer le diagramme de causalité et la cartographie pour identifier un nouveau type de transfert. Pour cela, l'équipe au sein de l'usine chargée de cette tâche peut s'appuyer sur l'analyse des données de dénombrement des indicateurs d'hygiène, faire appel à un conseiller extérieur et continuer l'analyse jusqu'à la résolution.

De plus, il est ici rappelé que les incidents doivent être enregistrés dans le plan de maîtrise sanitaire : fiche de non-conformité précisant la date de détection, la cause identifiée, l'entrée et la sortie du plan de contrôle renforcé, les actions correctives ou corrections (consigne, retrait ou rappel total ou partiel de lots), la validation d'éventuelles mesures de maîtrise, etc.

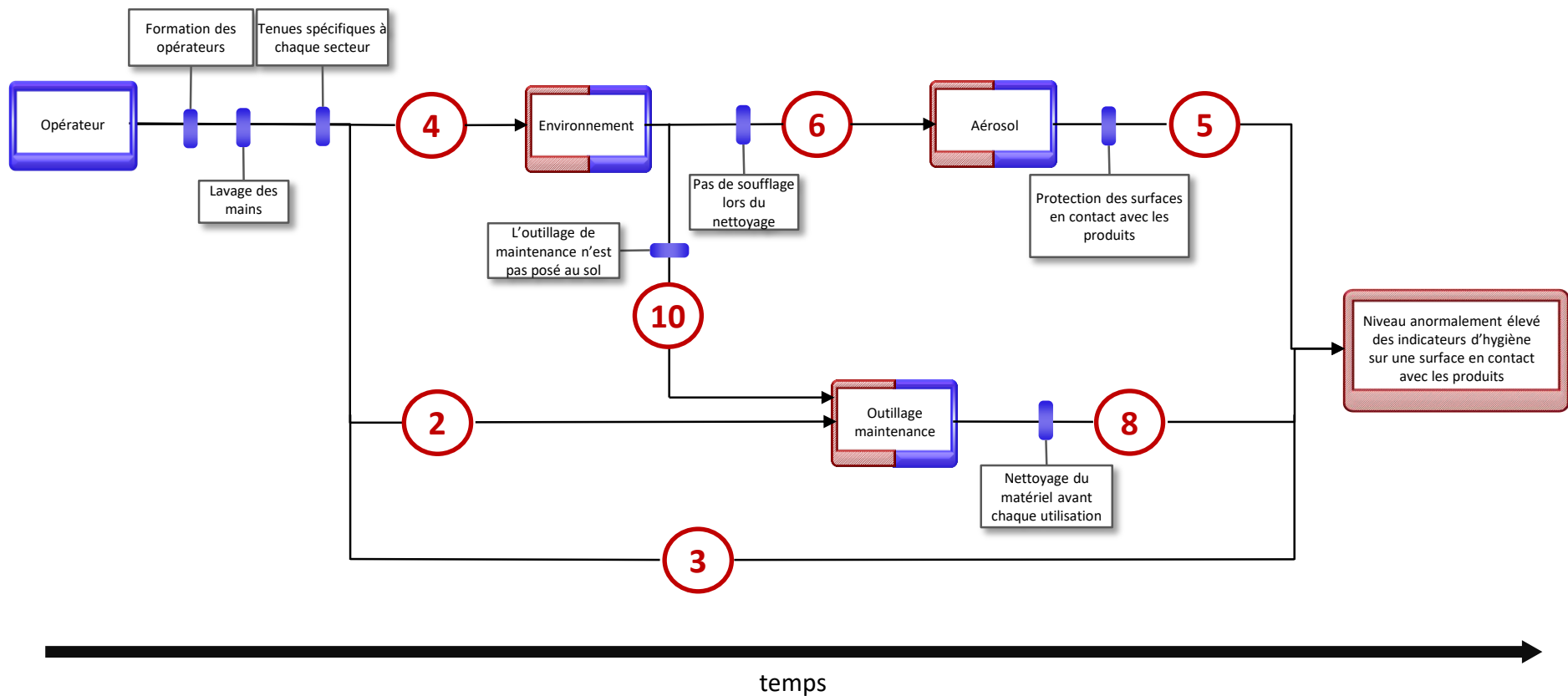


Figure 11. Exemple de diagramme de causalité

## ▪ Conclusion

Les transferts de poussières dans un environnement de production sont nombreux. La mise en place d'une cartographie des voies de transmission et de diagrammes de causalité aide à orienter le choix des sites de prélèvements, à déterminer l'origine d'une contamination et à mettre en place les actions correctives appropriées lorsqu'un incident a été détecté.

Il est recommandé d'appliquer ces méthodes de façon préventive afin de :

- vérifier que des mesures de maîtrise sont appliquées à tous les transferts de poussières identifiés ;
- avoir l'outil à disposition lorsque qu'un effet indésirable est détecté ;
- identifier les points faibles favorisant la dispersion des pathogènes dans l'usine et nécessitant une surveillance accrue, en particulier lors d'événements anormaux ayant un impact sur le fonctionnement de l'usine (p. ex. sous-effectif dû à l'absence d'un ou plusieurs opérateurs) ;
- utiliser cette méthodologie comme outil de communication, lors de formations par ex. pour sensibiliser les opérateurs sur les possibles transferts de contamination dans une usine de production de préparation en poudre pour nourrissons.

## 3.6. Prélèvements et analyses : aspects techniques

### 3.6.1. Techniques de prélèvement

#### 3.6.1.1. Techniques de prélèvement de l'environnement

##### ▪ Aspects généraux

Pour transférer les bactéries d'une surface à un milieu de culture, on utilise en général les méthodes suivantes qui comportent un ou plusieurs supports intermédiaires (ANSES 2014). On peut les classer ainsi :

- par empreinte : on applique sur la surface à échantillonner de la gélose contenue dans des boîtes ou adhérent à des lames ou des films, puis la gélose est directement placée dans un incubateur ;
- par frottis au moyen d'écouvillons, épongettes ou chiffonnettes, pré-humidifiés ou humidifiés, qui sont ensuite placés dans un milieu de dilution où ils sont agités, puis le milieu de dilution fait l'objet d'une analyse microbiologique. On peut ajouter à cette liste des dispositifs utilisant les ultrasons (Oulahal-Lagsir *et al.* 2000, Oulahal-Lagsir *et al.* 2003).

Leur inconvénient est que le coefficient de transfert de la surface au(x) support(s) intermédiaire(s) est rarement de 100%. En outre, ces méthodes ont pour résultat de mouiller les surfaces échantillonnées. Si cela ne pose pas de problème dans la partie humide de l'usine, en revanche, cela n'est pas souhaitable dans la partie sèche qui, par principe, devrait rester sèche et où il convient par conséquent d'utiliser d'autres méthodes :

- la méthode directe consiste à ramasser, éventuellement après grattage, le dépôt organique reposant sur la surface et à le transférer dans un milieu de dilution d'où une aliquote sera prélevée en vue d'une analyse microbiologique ;
- la méthode indirecte consiste à appliquer un ruban adhésif sur la surface à échantillonner, puis à appliquer le ruban sur de la gélose qu'il suffit d'incuber avant d'y dénombrer des colonies (Veulemans, Jacqmain, et Jacqmain 1970) ;

Cette méthode vient d'être revue par Bobal *et al.* (2019) qui préconisent l'emploi de marque-pages adhésifs en papier sur lesquels l'ADN des bactéries prélevées est quantifié par qPCR. Cette approche a été validée avec *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* et elle se révèle plus efficace que l'écouvillonnage. Le fait que l'on puisse ainsi mettre en évidence l'ADN des cellules vivantes, des cellules mortes ainsi que celui des cellules viables mais non cultivables (VBNC) est présenté par ces auteurs comme un atout de la méthode.

La méthode permettant d'estimer le nombre total de bactéries prélevables par une méthode quelconque (par exemple la méthode du ruban adhésif qui comporte deux transferts) est indiquée ci-après (Eginton *et al.* 1998, Midelet et Carpentier 2002, Veulemans, Jacqmain, et Jacqmain 1970) :

- prélever successivement exactement au même endroit avec chaque fois un nouveau support, et dénombrer les bactéries prélevées ; le nombre au prélèvement  $n$  est toujours inférieur au nombre au prélèvement  $n - 1$  ;
- porter sur un graphique en abscisses le numéro du prélèvement, en ordonnées le logarithme à base dix du nombre de bactéries prélevées : on observe en général que les points sont alignés ;
- estimer la somme des quantités prélevées par la formule :

$$N_T = \frac{N_1}{1 - 10^k}$$

où  $N_T$  est le nombre total de bactéries prélevables,  $N_1$  le nombre prélevé lors du premier prélèvement, et  $k$  la pente de la droite obtenue sur le graphique. Connaissant  $k$ , il suffit de mesurer  $N_1$  et d'appliquer la formule pour estimer le nombre total de bactéries prélevables. On notera que la valeur de  $k$  dépend des bactéries étudiées, de la nature de la souillure étudiée ainsi que de la nature et du relief du matériau de la surface.

#### ▪ Considérations normatives

La norme NF EN ISO 18593 de juillet 2018 décrit les méthodes horizontales pour les prélèvements de surface. Dans les cas où les prélèvements sont confiés à un prestataire extérieur, le prélèvement peut être réalisé sous accréditation à la condition que le prestataire applique les exigences de cette norme, ou d'un autre protocole qui aura fait l'objet d'une validation spécifique. La norme horizontale décrit les méthodes de prélèvements avec boîte de contact, par écouvillonnage (écouvillon sec ou humide) recommandé pour les zones d'accès difficiles ou bien irrégulières, ou avec éponge ou chiffonnette (sèches ou humides). Les avantages techniques des éponges sont significatifs (support compact ne nécessitant pas autant de liquide de récupération, manipulation plus aisée). Les restrictions d'utilisation des méthodes humides ont été rappelées dans la section précédente. La norme NF EN ISO 18593 recommande que la zone de prélèvement soit identifiée et qu'elle représente une surface de 1000 à 3000 cm<sup>2</sup> pour la détection des micro-organismes (ex. salmonelles, *Cronobacter*). Pour les dénombrements, la surface recommandée est de l'ordre de 100 cm<sup>2</sup>. Des précautions doivent être prises pour ne pas réaliser les prélèvements de détection immédiatement ou peu après les opérations de nettoyage et de désinfection, afin d'éviter de prélever des formes viables non cultivables (ANSES 2018). La norme recommande de prélever après au moins 2 heures de production ou en fin de cycle de production (avant nettoyage/désinfection). Lorsque la technique de prélèvement conduit à apporter sur les surfaces de l'humidité ou un milieu nutritif, la norme rappelle la nécessité de procéder à un nettoyage et un séchage de la zone de prélèvement et/ou une désinfection/dégraissage, par exemple à l'alcool. La norme aborde par ailleurs les avantages et inconvénients de l'usage des neutralisants choisis en fonction des désinfectants utilisés.

L'acte de prélèvement peut être indiqué comme étant réalisé sous accréditation sur le rapport d'analyse avec l'indication de la norme NF EN ISO 18593 en texte de référence. Le rapport doit mentionner : le dispositif utilisé, la date, l'heure, le lieu de prélèvement, la date de début d'analyse, ainsi que toute information complémentaire concernant le déroulement, et l'identification complète de l'échantillon.

La traçabilité des informations mentionnées ci-dessus doit être assurée dans le système de gestion de l'information du laboratoire (*Laboratory Information Management System* ou LIMS) qu'il s'agisse d'échantillons de l'environnement et de produits finis. Les professionnels commanditaires de l'analyse devraient idéalement détenir ces informations pour les archiver au même titre que les résultats obtenus.

La norme NF EN ISO 18593 décrit en complément les modalités techniques de préparation des échantillons environnementaux au laboratoire afin d'obtenir un échantillon pouvant être analysé à partir du support fourni au laboratoire : agitation des écouvillons, placement des chiffonnettes en solution, expression des éponges.

#### **3.6.1.2. Techniques de prélèvement des produits**

Les diverses techniques de prélèvements disponibles pour constituer les échantillons destinés à l'analyse des produits n'appellent pas de remarques particulières si ce n'est qu'elles ne doivent pas constituer des sources de contamination ni des lots de produits contrôlés ni des échantillons constitués. Pour cette raison l'usage des échantillonneurs ou préleveurs automatiques tend à se développer afin de pouvoir contrôler une

production tout au long du fonctionnement en limitant les interventions humaines et les risques de contamination associés. En production industrielle, et sur des produits dont le prix est modéré, il est également souvent simple de faire parvenir des unités de vente aux consommateurs (UVC) aux laboratoires lorsque l'analyse porte sur un produit conditionné en UVC.

Pour que le résultat d'analyse puisse être exploité de façon optimale, il est fondamental que chaque unité constituant l'échantillon soit rattachée à une quantité de produit parfaitement définie par un numéro de lot. L'identité de l'unité de produit analysée doit figurer obligatoirement sur le rapport d'analyse telle qu'elle a été indiquée par le client du laboratoire sans modification aucune. L'entreprise ne fournit pas obligatoirement l'identité complète du lot au laboratoire, mais parfois un numéro ou un code interne d'unité pour analyse. Dans ce cas, le rattachement de ces codes au lot est réalisé par une traçabilité interne à l'entreprise.

### **3.6.2. Méthodes analytiques**

Pour pouvoir être accréditées, les analyses de prélèvement d'environnement doivent impérativement être réalisées selon des méthodes dont le domaine d'application comprend les contrôles d'environnement dans le domaine de la production et de la distribution des aliments. Si c'est le cas de la majorité des méthodes normalisées ou des méthodes alternatives validées selon NF EN ISO 16140 ou NF EN ISO 16140-2, ce n'est pas une règle absolue. Ainsi, pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices, la méthode ISO 15213:2003 prévoit effectivement les prélèvements d'environnement dans son domaine d'application alors que ce n'est pas le cas de la norme NF V08-061 qui utilise d'autres milieux. Les réactifs de détection des bactéries pathogènes dans les aliments n'ont pas tous fait l'objet d'une validation sur prélèvements d'environnement pour des raisons diverses. Ainsi, certaines méthodes alternatives validées NF EN ISO 16140 ou NF EN ISO 16140-2 de recherche de salmonelles ne prévoient pas l'environnement de production des aliments dans leur domaine d'application. Il est donc nécessaire de vérifier le domaine d'application des méthodes normalisées ou alternatives dans les documents de référence avant de choisir celle qui sera utilisée.

Sous réserve que le texte de la méthode d'analyse prévoie effectivement les prélèvements d'environnement dans son domaine d'application, alors les échantillons d'environnement peuvent être traités comme des échantillons d'aliments. L'expression du résultat pouvant cependant être spécifique et exprimée par rapport à une surface ou bien en termes de détection / non-détection par échantillon.

Si l'analyse est réalisée sous accréditation, cela est indiqué avec résultat une marque particulière explicitée par le laboratoire. La méthode d'analyse utilisée doit être indiquée par la mention de la norme (ou du numéro de certificat de validation le cas échéant) L'accréditation du résultat de contrôle environnemental est possible, que le laboratoire ait été ou non prestataire pour la réalisation du prélèvement.

Les limites des techniques d'analyse utilisées pour les contrôles d'environnement sont identiques à celles qui sont mentionnées en section 3.4.3.2 pour les analyses de produits.

Concernant la recherche de *Salmonella*, *Cronobacter* ou encore la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* dans les produits finis, le Règlement (CE) n°2073/2005 modifié précise les méthodes autorisées, à savoir les méthodes de référence (ou tout autre méthode ayant été jugée équivalente selon la norme NF EN ISO 16140 ou NF EN ISO 16140-2 ou autre protocole analogue reconnu au niveau international). Ces méthodes de référence sont, respectivement, les normes NF EN ISO 6579-1:2017, NF EN ISO 22964:2017 et NF EN ISO 21528-1 et -2.

Un laboratoire qui souhaite appliquer une méthode interne et fournir un résultat sous accréditation doit d'une part, avoir validé son protocole analytique et satisfaire aux exigences de la norme NF EN ISO 17025:2017 et d'autre part, avoir préalablement vérifié sa capacité à atteindre les performances requises au regard de la matrice considérée. La future norme NF EN ISO 16140-3 précisera ces modalités de vérification.

Pour valider une méthode interne, un laboratoire devra appliquer le protocole de la norme NF EN ISO 16140-4, une fois publiée (publication prévue en 2019). Cette obligation s'applique également pour valider la mise en œuvre de prises d'essai non prévues par des protocoles validés existant (exemple : regroupement de prise d'essai).

L'ensemble des méthodes alternatives validées Afnor qui peuvent être mises en œuvre sont disponibles sur le site <https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/>.



### 3.6.2.1. Réalisation des prises d'essai en laboratoire et autres précautions analytiques

Pour pouvoir rendre des résultats d'analyses sous accréditation, les laboratoires de microbiologie doivent fonctionner, sans écart possible, selon les exigences générales et recommandations prescrites par la norme NF EN ISO 7218. Cette norme ne mentionne pas de précautions particulières concernant l'analyse des poudres de lait.

Pour les produits laitiers, les conditions de réalisation des prises d'essai en laboratoire et leur dilution première sont décrites dans la norme NF EN ISO 6887-5 d'octobre 2010. Ces conditions doivent être respectées impérativement pour qu'un résultat d'analyse soit fourni sous accréditation. Pour ce qui concerne les poudres de lait, ces conditions concernent la modalité de dilution (on place la poudre dans le diluant et non l'inverse) et l'agitation de la solution pour dissoudre la poudre. Après agitation, la solution doit être laissée au repos pendant 5 min.

La norme NF EN ISO 6579-1 demande quant à elle de prolonger l'incubation des milieux d'enrichissement sélectifs de  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  supplémentaires pour les produits laitiers secs (et fromages) par rapport au protocole appliqué aux autres types de produits. Le non-respect de cette précaution, prévue pour la détection des salmonelles stressées et les recherches en cas de TIAC, conduirait à la non-accréditation de l'analyse sur poudre de lait.

Pour ce qui concerne les méthodes alternatives validées NF EN ISO 16140 ou NF EN ISO 16140-2, le laboratoire doit appliquer impérativement les prescriptions du fabricant quand elles existent pour le traitement des poudres de lait.

Au-delà de ces considérations normatives en vigueur, de récents travaux de recherche ont souligné l'impact des modalités de déshydratation et réhydratation des poudres de lait sur le taux de survie de *Salmonella* et *Cronobacter* (Lang *et al.* 2016). Par ailleurs, il a été démontré que les contraintes mécanique et structurale, induites par le stress osmotique pendant les étapes de séchage, sont importantes pour la destruction cellulaire de *L. monocytogenes*. Une variabilité de la capacité à résister à la dessiccation a été observée pour différentes souches de *Listeria monocytogenes* (Zoz *et al.* 2017). Plus globalement, des travaux de recherche ont examiné l'impact de la fréquence de désinfection couplé à un séchage sur la survie et la persistance de *L. monocytogenes* ainsi que les phénomènes adaptatifs au séchage par des études transcriptomique et protéomique (Zoz 2016).

D'autres travaux de recherche devraient donc être menés pour approfondir les connaissances scientifiques dans ce domaine. Ces connaissances sont précieuses pour améliorer la maîtrise de l'hygiène des environnements de production mais également pour mieux évaluer les risques de sous-estimation de la présence de *Salmonella* et *Cronobacter* dans ces matrices par défaut de détection.

### 3.6.2.2. Recherche et/ou dénombrement des *Enterobacteriaceae*

Pour réaliser la recherche et/ou le dénombrement des entérobactéries, les laboratoires disposent de la méthode NF EN ISO 21528-1 (recherche et détermination du nombre le plus probable, NPP) et NF EN ISO 21528-2 (dénombrement en milieu solide). Il existe par ailleurs la norme française NF V08-054.

Le Règlement (CE) n°2073/2005 modifié préconise l'utilisation de la norme ISO pour réaliser le dénombrement des *Enterobacteriaceae* en tant que critère d'hygiène de procédé des préparations en poudre pour nourrissons.

Il est important de rappeler que la norme ISO et la norme NF ne sont pas équivalentes bien qu'elles utilisent au départ le même milieu de dénombrement : la norme NF ne contient pas d'étape de confirmation des colonies d'entérobactéries, et, de ce fait, cette norme ne permet que le dénombrement des entérobactéries « présumées ». Elle conduit donc à une surévaluation du nombre de colonies, en contrepartie d'un temps de travail plus court. Cette méthode française ne devrait donc pas être utilisée pour vérifier le respect du critère du règlement, ou alors en parfaite connaissance de cause.

Le texte de la norme NF EN ISO 21528 précise :

« NOTE : La température d'incubation de 37 °C pour l'enrichissement et l'isolement/le dénombrement sur boîte est généralement utilisée lorsque les *Enterobacteriaceae* sont recherchées et dénombrées en tant qu'indicateur d'hygiène. Sinon, une température de 30 °C peut être choisie lorsque la détection ou le dénombrement des *Enterobacteriaceae* est entrepris(e) dans le cadre d'un procédé technologique et comprend des *Enterobacteriaceae* psychrotrophes. »

Cette note de l'ISO (reprise en partie principale par la norme française) conduit donc à choisir la température de 37 °C pour réaliser ces recherches ou ces dénombrements d'entérobactéries. En effet, le Règlement (CE) n°2073/2005 ne préconisant rien quant à la température d'incubation, il est cependant pertinent de considérer que les entérobactéries sont recherchées ou dénombrées en tant que critère d'hygiène des procédés et non pour vérifier par exemple le respect du barème temps-température de pasteurisation pour lequel l'incubation à 30 °C aurait plus d'intérêt.

Il est enfin rappelé dans la norme ISO, que pour les dénombrements attendus comme inférieurs à 100/g, la technique NPP est la mieux adaptée. Il s'avère que la technique NPP est une technique particulièrement lourde et coûteuse lorsqu'elle est réalisée en tubes<sup>8</sup>. Elle est donc rarement utilisée pour des analyses quotidiennes sur de tels produits sauf avec des systèmes totalement automatisés.

Le texte de la norme NF EN ISO 21528-1 portant sur la partie recherche ne mentionne pas de calcul de LOD<sub>50</sub> dans le dossier de caractérisation de la méthode car les essais ont été réalisés avec des concentrations bactériennes élevées dans les prises d'essai, ce qui conduit par ailleurs la méthode de recherche à avoir une sensibilité et une spécificité de près de 100 %. Son utilisation pour rechercher des présences d'entérobactéries dans les produits ou les prélèvements d'environnement, lorsqu'on a des raisons de penser que le nombre d'ufc par prise d'essai est très faible, devrait être décidée en toute connaissance de cause.

### 3.6.2.3. Évaluation du travail des laboratoires

Pour évaluer la qualité du travail d'un laboratoire, une entreprise dispose de plusieurs outils.

L'accréditation par le COFRAC apporte des garanties sur la compétence du laboratoire. Le respect des modes opératoires et des normes est vérifié lors des audits réalisés par le COFRAC. Les limites du dispositif sont liées au fait qu'un audit est réalisé à un instant précis, et qu'il ne permet pas d'évaluer le fonctionnement au long cours du laboratoire. L'examen des rapports d'analyse doit permettre de vérifier au quotidien le respect des exigences de la réalisation des paramètres analytiques sous accréditation (voir plus haut). La présence d'un logo COFRAC sur un rapport d'analyse ne signifie pas obligatoirement que l'ensemble des résultats d'analyse ont été obtenus sous accréditation. Une marque spécifique doit indiquer les prestations (prélèvement environnement ou produit, analyse) réalisées sous accréditation.

Compte tenu du caractère très sensible des contaminations des préparations en poudre pour nourrissons, les entreprises ont également la possibilité de réaliser elles-mêmes des audits clients complémentaires à ceux du COFRAC ou les faire réaliser par tierce-partie. Cette pratique d'audits des laboratoires prestataires est très courante dans les groupes agroalimentaires- internationaux, mais moins dans les entreprises françaises.

Les laboratoires internes aux entreprises réalisant les auto-contrôles qui ne sont pas accrédités doivent *a minima* participer à un processus d'essais de comparaison inter-laboratoires (Article L202-3 du Code Rural et de la Pêche Maritime issu de l'article 52 de la récente loi « EGAlim »).

### 3.6.3. Intérêt du recours à la caractérisation approfondie des souches

Les méthodes analytiques utilisées depuis des décennies pour la recherche des pathogènes dans les aliments se sont basées en premier lieu sur des principes de culture bactérienne. Ces méthodes aboutissent, en cas de détection, à l'isolement de la bactérie pathogène, préalable nécessaire à la confirmation de son identification taxonomique et sa caractérisation. Etant admis d'un point de vue épidémiologique que les isolats reliés ont des caractères communs qui les différencient des isolats non reliés, des méthodes moléculaires de plus en plus discriminantes ont progressivement vu le jour.

Les méthodes PFGE et MLVA<sup>9</sup> ont été et sont encore largement utilisées pour la détection et l'investigation des épidémies d'origine alimentaire (Jacobs, Kuiling, et van der Zwaluw 2014) ainsi que pour l'identification des sources de contamination au sein d'ateliers de production. Des applications pour la caractérisation des *Cronobacter* dans les usines de production de poudres sont rappelées dans la revue de Forsythe (2018). Toutefois, ces méthodes ne sont plus considérées aujourd'hui comme les plus performantes pour répondre à ces objectifs.

<sup>8</sup> Absence de méthode NPP en microplaques pour le dénombrement des *Enterobacteriaceae* validée ISO 16140, à la date de rédaction du rapport.

<sup>9</sup> Respectivement "Pulsed Field Gel Electrophoresis" et "Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis"

Dès 2011, de nouvelles générations de technologies basées sur le séquençage haut débit ont été mises en œuvre pour révéler l'émergence de bactéries pathogènes transmissibles par l'aliment et pour retracer l'évolution et la diffusion de la souche responsable d'une épidémie à *E. coli* O104:H4 en Allemagne (Mellmann *et al.* 2011). Plus récemment, une épidémie de salmonelloses est survenue en France (30 cas), Belgique (1 cas) et Luxembourg (1 cas) entre août 2018 et février 2019, liée à des préparations en poudre pour nourrissons contaminées par *Salmonella* Poona : ces nouvelles méthodes ont permis d'identifier la souche épidémique et la source d'exposition et ainsi d'éviter de nouveaux cas (ECDC et EFSA 2019).

### 3.6.3.1. Le séquençage du génome entier

Au-delà de leur intérêt dans le domaine de la santé publique, les récentes avancées technologiques basées sur le séquençage de génome entier (*Whole Genome Sequencing* - WGS) présentent des avantages évidents pour améliorer la qualité et la sécurité des denrées alimentaires (Allard *et al.* 2018, Kovac *et al.* 2017). Ces technologies WGS supplantent les diverses méthodes de biologie moléculaire précitées, en vigueur depuis de nombreuses années et longtemps utilisées pour confirmer l'identification de la souche bactérienne, voire la caractériser. Ce remplacement progressif se met en place au rythme de la réduction des coûts d'analyse WGS et du développement des outils d'interprétation des séquences d'ADN, permettant de produire des informations précises et utiles pour les gestionnaires.

Les génomes entiers ainsi séquencés peuvent être analysés par différentes approches. La plus discriminante est l'analyse SNP, pour *Single Nucleotid Polymorphism*. Le polymorphisme de chaque nucléotide est étudié par comparaison des génomes. Ainsi, deux génomes se différencieront par un certain nombre de SNP. Il est admis que plus les génomes se distinguent par un nombre élevé de SNP, plus ces micro-organismes sont éloignés d'un point de vue épidémiologique.

Des travaux récents financés par l'EFSA (projet Engage<sup>10</sup>) ont démontré que le sérotype et le phénotype prévisible de résistance aux antibiotiques d'une souche de *Salmonella* pouvaient être déterminés par WGS. Un rapport conjoint de la FAO et de l'OMS, publié en 2016, résumait les avantages à adopter les technologies WGS dans le domaine de la sécurité des aliments : une méthode universelle aux performances inégalées, une mise en œuvre facilitée par plusieurs étapes automatisables, une rapidité d'obtention d'accès à des informations très détaillées, des données faciles à partager et à remobiliser, une plus grande confiance dans la prise de décision (FAO 2016).

Jagadeesan *et al.* (2019) ont souligné l'intérêt d'une utilisation en routine des technologies de séquençage de génomes entiers. Ainsi, après obtention répétée d'autocontrôles défavorables et séquençage des isolats incriminés, les analyses WGS peuvent faciliter le suivi du cheminement de la contamination à l'intérieur de l'usine. Il peut être conclu, si tel est le cas, à la persistance d'une source de contamination et faciliter ainsi la mise en œuvre de mesures de maîtrise adaptées. Aujourd'hui, peu de publications décrivent la mise en œuvre de ces nouvelles technologies de séquençage pour étudier les isolats de *Cronobacter* détectés dans les préparations en poudre pour nourrissons. Gopinath *et al.* (2018) ont récemment souligné l'intérêt de cette technologie pour mieux appréhender la diversité des populations microbiennes au regard de leur phylogénie et de leurs capacités métaboliques.

De manière plus générale, l'analyse approfondie de séquences issues d'une grande variété de génomes de souches isolées de préparations en poudre pour nourrissons contribueraient à la détection de la persistance d'une contamination au sein d'usine et l'identification de caractéristiques génétiques essentielles pour l'adaptation de ces pathogènes aux procédés de production de ces produits.

Pour renforcer les hypothèses et aider à la prise de décision concernant les sources de contamination, les modes et voies de transmission des pathogènes, il est essentiel de garder à l'esprit que les données WGS ne devraient pas être considérées indépendamment des données épidémiologiques disponibles (les métadonnées<sup>11</sup>) (FAO 2016).

Plusieurs approches sont possibles dans ce domaine pour distinguer les isolats ou étudier leur proximité génomique (analyses SNP, typologie des arbres phylogénétiques produits par analyse bio-informatique, etc.) (Pightling *et al.* 2018, Schurch *et al.* 2018). L'observation d'une grande proximité génomique entre une

<sup>10</sup> <http://www.engage-europe.eu>

<sup>11</sup> "Metadata refers to data providing information about one or more aspects of the data. In the case of genome sequencing, it could refer to where the organism was isolated, when it was isolated etc." (FAO, 2016)

souche d'origine humaine et une souche isolée d'un aliment renseigne sur la proximité génétique de ces souches mais ne permet pas de conclure nécessairement que le cas clinique observé a été directement causé par ingestion de l'aliment analysé. Les données contextuelles de prélèvement, d'isolement et les données de traçabilité sont précieuses et devraient être considérées avant de conclure sur la force du potentiel lien causal.

Plus globalement, un partage renforcé des données de séquençage associées à un minimum de métadonnées permettrait à l'ensemble du secteur professionnel concerné, de mettre en place une approche préventive plus complète. En effet, l'analyse approfondie de l'information génomique des bactéries pathogènes isolées permet d'investiguer leur capacité à former des biofilms, à résister (antibiotiques, désinfectants), à survivre aux conditions rencontrées (traitements thermiques, milieux déshydratés, acides, etc.). La pertinence de cette analyse génomique sera cependant limitée si la représentativité de la diversité génomique des collections étudiées est faible vis-à-vis de l'ensemble des populations de pathogènes circulant dans les différents environnements microbiens, tout au long de la filière de production considérée.

Un fabricant de préparations en poudre pour nourrissons pourra d'autant plus se prémunir d'une future contamination qu'il sera en mesure d'évaluer si son procédé de fabrication permet de maîtriser la plupart des bactéries auxquelles il est susceptible de devoir faire face (souches possédant des caractéristiques spécifiques liées à la température, l' $a_w$ , la résistance aux désinfectants, etc.). Seule une démarche collective multisectorielle et multidisciplinaire lui garantira un minimum de représentativité dans la diversité des souches de pathogènes qu'il devra prendre en compte pour valider son procédé. Pour cela, l'échange de données s'avère essentiel. Par ailleurs, ces échanges s'effectuant dans un cadre collaboratif, ce peut être l'occasion de mobiliser des compétences analytiques et bio-informatiques nécessaires, parfois non disponibles localement.

### 3.6.3.2. Les « omiques »

Bien qu'encore au stade de recherche et au-delà d'une caractérisation approfondie des pathogènes par séquençage, il serait possible d'appliquer de nouvelles générations de technologies de séquençage pour caractériser l'ensemble des micro-organismes présents dans un échantillon.

La métagénomique permet, entre autres, l'étude des écosystèmes microbiens impliqués dans l'altération des aliments. Cette méthode, plus coûteuse que les méthodes classiques, pourrait permettre d'étudier le comportement des pathogènes au sein des communautés microbiennes présentes dans les produits et dans les environnements de production. Les conditions de fabrication et de stockage des produits finis et d'utilisation des matières premières influencent leur composition microbienne et notamment celle des pathogènes (Jagadeesan *et al.* 2019). Cette approche par métagénomique a déjà été mise en œuvre dans ce but par Yang *et al.* (2016) pour évaluer l'évolution de pathogènes lors de la production de viande bovine.

Un consortium international, récemment mis en place, poursuit cet objectif à l'initiative de grands groupes industriels (Jagadeesan *et al.* 2019).

Si les approches par séquençage peuvent révéler des différences entre les séquences des souches, certaines de ces séquences ont les modalités d'expression phénotypique inconnues à ce jour. Dans ce cas, d'autres approches, telles que la (méta-)protéomique (détection et caractérisation des protéines) et la métabolomique (étude des variations métaboliques en réponse aux conditions environnementales par détection et quantification de métabolites) pourraient apporter des informations complémentaires.

Ces nouvelles approches regroupées sous le terme de « omiques » (en anglais « *omics* ») offrent de grandes possibilités pour la recherche. Leur application à bon escient requerra des compétences et expertises particulières, qui pourront être réunies à travers une large collaboration multidisciplinaire et sectorielle. Les nouvelles typologies de données, produites rapidement et en grande quantité par ces nouvelles technologies, représentent un défi important à relever pour les évaluateurs des risques. Les modèles d'appréciation quantitative des risques devront également être adaptés pour intégrer ces données issues des « omiques » et appuyer les gestionnaires des risques dans leur prise de décision (Cocolin *et al.* 2018).

#### 4. REPONSES AUX QUESTIONS POSEES

##### Analyse des dangers du procédé

1. **Quels sont les principaux dangers microbiologiques associés aux préparations en poudre pour nourrissons au sens du règlement (UE) n°609/2013, et cela quels que soient leurs ingrédients principaux (lait, riz, lécithine de soja, ...)** ?

*Salmonella* spp et *Cronobacter* spp sont les principaux dangers dont la maîtrise est jugée essentielle pour la sécurité des préparations en poudre pour nourrissons.

La liste de dangers devrait être reconsidérée par les producteurs de préparation en poudre pour nourrissons à chaque évolution de formulation ou de procédé et au regard de nouvelles données épidémiologiques.

2. **À la lecture des quatre plans de maîtrise sanitaire adressés, quelles sont les principales mesures de maîtrise des dangers identifiés à la question 1 (bonnes pratiques d'hygiène, points de vigilance, programmes prérequis opérationnels, mesures associées aux points critiques, etc.) ? Quelles sont les conditions de leur efficacité ?**

Compte tenu de l'absence de traitement d'assainissement final, la maîtrise de ces dangers repose sur l'application rigoureuse et systématique de mesures générales de maîtrise telles que :

- les spécifications microbiologiques des ingrédients ajoutés après le séchage ;
- la prévention des transferts de contaminants de la poudre vers l'environnement des équipements et réciproquement ;
- le nettoyage et, si de l'eau est utilisée p. ex. pour la désinfection, le séchage de l'environnement et des équipements.

Une attention particulière devrait être portée à bannir la présence d'eau et les points d'accumulation potentiels dans la zone à très haute hygiène.

Ces mesures de maîtrise, qui sont toutes d'une égale importance, semblent connues des entreprises ayant communiqué leur PMS. En revanche, les PMS ne décrivent pas de façon complète les actions de nettoyage, de désinfection et de séchage, le suivi de la gestion des nuisibles, la qualification des fournisseurs, le plan d'analyses microbiologiques et les procédures détaillées de ces dernières, l'analyse des tendances.

En outre, des insuffisances ou même l'absence d'information dans les PMS concernent la surveillance de l'hygrométrie et de la pression d'air dans les zones à très haute hygiène, la conception hygiénique des locaux et des équipements, la filtration de l'air, la surveillance de la santé du personnel et la formation de ce dernier aux activités en zones sensibles, l'hygiène du conditionnement des poudres, le prélèvement des échantillons dans l'environnement de fabrication et les conséquences en cas de non-conformité des résultats des analyses de l'environnement.

3. **Les dossiers joints illustrent la diversité des procédés et des stratégies des entreprises. Quelle(s) évolution(s) des procédés de fabrication et des pratiques (p. ex. augmentation du débit de séchage, modification des formulations, p. ex. réduction de la fréquence des nettoyages, réduction du nombre de prélèvements soumis à analyses) devraient conduire à reconsidérer l'efficacité des mesures de maîtrise identifiées précédemment ? Ce bilan sera effectué sur la base des quatre PMS et des audits réalisés sans viser l'exhaustivité.**

Les PMS communiqués au groupe de travail donnent très peu d'indications sur l'évolution des procédés et/ou des formulations des produits, pas plus que sur les stratégies des entreprises. De manière générale, toute modification du procédé et/ou des formulations du produit devrait conduire à reconsidérer l'analyse des dangers.

## Évaluation des stratégies d'autocontrôles

### **4. Le rapport de l'Afssa de 2008 insiste sur « la nécessité de surveiller avec rigueur l'hygiène de l'environnement de fabrication ». Comment concevoir un plan de contrôle de l'environnement efficace ? Comment apprécier l'efficacité d'un plan de contrôle de l'environnement préexistant ?**

En préambule, il est important de rappeler qu'il appartient à chaque usine de mettre au point sa propre démarche, car aucune recommandation générale, applicable en toutes circonstances, ne peut raisonnablement être établie. Les recommandations données ci-après devraient être modulées en fonction de l'usine et de la ligne de production.

À noter encore que l'on ne sait pas mesurer correctement la contamination réelle des surfaces. Les méthodes disponibles ne permettent que de déterminer la charge bactérienne qui leur est « accessible ». En effet, on ne sait pas détacher 100 % des bactéries, et on ne sait pas dénombrer 100 % des bactéries détachées. Donc, les méthodes disponibles renseignent moins sur la réussite du nettoyage et de la désinfection que sur leur défaillance (quand la charge bactérienne est suffisamment grande pour être détectable et/ou quantifiable).

Tout d'abord, sur les sites de production de préparations en poudre pour nourrissons, il apparaît essentiel de mettre en place et de respecter un zonage hygiénique d'intensité croissante pour tenir compte de la vulnérabilité du produit à la contamination environnementale (p. ex. zone de très haute hygiène, zone de haute hygiène, zone d'hygiène intermédiaire, et enfin zone d'hygiène de base). Au sein de chacune de ces zones, il convient de distinguer les surfaces en contact direct avec le produit, les surfaces proches, et les surfaces plus éloignées (par ex. les murs, les sols, le plafond). La stratégie d'échantillonnage dans l'usine sera zone et surface dépendante. Au plus près du produit, l'échantillonnage vise normalement le repérage des *Enterobacteriaceae*, en effet il y a très peu de chance d'y détecter *Salmonella* et *Cronobacter* (cf. section 3.5.1 pour plus de détails). La méthode de prélèvement doit également être adaptée à la zone et la surface (cf. section 3.6.1).

La stratégie d'échantillonnage à des fins d'analyse sera fonction de l'objectif de cet échantillonnage (cf. section 3.5.1) : détecter une contamination, établir un niveau de référence, évaluer si ce niveau est dépassé ou pas, rechercher une source de contamination. Afin d'établir un « niveau de référence », il est suggéré de suivre très régulièrement la contamination surfacique lorsqu'il est considéré de façon responsable que l'usine fonctionne dans les conditions hygiéniques optimales.

La recherche systématique de la cause d'un dépassement du niveau de référence ou de la présence d'un pathogène dans l'environnement de l'usine, ou a fortiori dans le produit fini, est nécessaire (cf. outils proposés en section 3.5.2). Des actions correctives devraient être alors mises en place et en relation, un plan d'échantillonnage renforcé activé (cf. exemple proposé en section 3.5.1). Le retour « à la normale » se fera une fois le niveau de référence à nouveau respecté, sous réserve que les opérations d'hygiène soient conduites de façon reproductible.

### **5. En cas de contamination récurrente de l'environnement au-delà d'un seuil prédéfini, quelles mesures de contrôle renforcées et quelles mesures correctives faut-il appliquer ? Comment valider l'efficacité de ces mesures ? Est-il possible d'apprécier l'impact de la durée de cette phase sur la fiabilité de la validation ?**

La contamination récurrente de l'environnement au-delà d'un seuil prédéfini doit entraîner un plan de contrôle renforcé de l'environnement et des produits finis. Il est recommandé de disposer dans le PMS d'un arbre décisionnel pour gérer les non-conformités rencontrées à la fois dans les produits finis et dans l'environnement.

La gestion des non-conformités sur le site de production devrait comporter au moins :

- l'application d'une procédure de nettoyage-désinfection « corrective » de tous les matériels et surfaces de la zone concernée, avec éventuellement une modification du plan de nettoyage et désinfection (par ex. produits détergents plus efficaces, temps d'action augmentés, démontage et nettoyage de certains éléments) ;

- si, à titre exceptionnel, un nettoyage humide est effectué en zone sèche, un soin particulier doit être apporté au séchage ;
- un plan de contrôle renforcé de l'environnement et des produits finis produits après la découverte de l'incident, ainsi que - dans la mesure du possible - un contrôle rétrospectif des produits finis ;
- une analyse des causes ;
- les modalités de blocage, de rappel et de retraits des lots ou parties de lot ;
- les modalités de sortie d'un plan de contrôle renforcé.

Les modalités de contrôle renforcé pour l'environnement sont impossibles à définir de façon unique et applicables par toutes les usines. Ces modalités (par ex. augmentation de fréquence, augmentation du nombre de sites prélevés, utilisation d'autres techniques d'analyse ou de prélèvement telles que grattage, surface de prélèvement augmentée pour chaque prélèvement, utilisations d'adhésifs) devraient être définies pour chaque usine.

L'analyse des causes est essentielle car elle conditionne la sortie de phase de contrôle renforcé. La cause devrait donc être rapidement recherchée afin de limiter le plus possible cette phase :

- par des inspections visuelles de toutes les zones de l'usine, y compris les abords (zone d'hygiène de base) pour détecter les points d'accumulation (trous, carrelage cassés, résine détériorée, moisissures, humidité). Ces inspections visuelles sont cruciales même en l'absence de détection d'indicateurs ou de pathogènes ; notamment, les défauts d'infrastructure, de matériels ou d'hygiène doivent être résolus dès la première identification, sans cela un plan de contrôle renforcé et/ou un arrêt de la production devrait être décidé ;
- par une vérification du respect de toutes les procédures et instructions ;
- par l'identification d'événements inhabituels survenus dans le passé (par ex. pluies abondantes, effraction des locaux, présence de nuisibles, visites, audits, livraison de produits contaminés, pannes, grèves, épidémie parmi le personnel, nouveau personnel, nouveaux ingrédients ou contenants, commande exceptionnelle, changement de laboratoire, etc.) ;
- par la vérification de la santé du personnel dans le respect du droit du travail.

Les causes principales de contamination devraient avoir normalement été identifiées par l'analyse des dangers. Dans le cas contraire, différents outils peuvent venir compléter la démarche HACCP et être utilisés notamment l'analyse des défaillances (cartographie des transferts de contamination et diagramme de causalité, 3.5.2) lorsque les premières investigations n'ont rien détecté. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire peut se révéler utile pour identifier les sources de contamination. Le contrôle renforcé doit être poursuivi tant que la cause d'une contamination supérieure au niveau de référence dans l'environnement de l'usine ou de la présence d'un pathogène n'est pas identifiée et maîtrisée. L'efficacité des mesures mises en place est jugée au moyen du suivi des indicateurs (*Enterobacteriaceae*).

Quand la cause est identifiée, corrigée ou maîtrisée (au besoin par la mise en place de nouvelles mesures de maîtrises validées), le plan de contrôle renforcé peut être suspendu. L'incident doit être l'occasion de retours d'expériences, de formations et sensibilisation du personnel aux PRP (par ex. respect des zones, nettoyage et désinfection et séchage des surfaces). Ces incidents doivent être enregistrés dans le plan de maîtrise sanitaire : fiche de non-conformité précisant la date de détection, la cause identifiée, l'entrée et la sortie du plan de contrôle renforcé, les actions correctives ou corrections (consigne, retrait ou rappel total ou partiel de lots), la validation d'éventuelles nouvelles mesures de maîtrise, etc.

**6. Parmi l'ensemble des mesures de contrôle de l'efficacité du nettoyage, comment apprécier l'intérêt des inspections visuelles, tant sur la propreté des locaux à l'issue du nettoyage que dans l'appréciation du séchage après un lavage à l'eau ? Comment les articuler avec les autres formes de vérification ?**

L'inspection visuelle est essentielle. Elle permet de repérer par exemple l'accumulation de dépôts indésirables devenus visibles, donc inacceptables, des flaques d'eau, des fuites, etc. Toutefois, elle ne donne aucune indication sur la charge microbiologique des surfaces et ne permet pas de repérer l'humidité qui subsiste sur les parois internes ou externes des équipements ou sur les sols.

Il convient de réaliser que, dans les équipements de conception ancienne (ne respectant pas les règles de la conception hygiénique<sup>12</sup>), existent des recoins où l'eau peut s'accumuler, et donc être longue à s'évaporer). Une inspection visuelle ne peut en aucun cas aider à déterminer si la zone sèche est de nouveau sèche après un grand lavage.

**7. En complément des éléments relatifs aux indicateurs d'hygiène des procédés dans le rapport de 2008 susvisé, est-il possible d'établir un lien de probabilité entre une contamination récurrente dans l'environnement et une contamination des produits ?**

De façon générale, il n'est pas possible d'établir un lien de probabilité entre une contamination récurrente dans l'environnement et une contamination des produits qui s'appliquerait à l'ensemble des usines. En revanche, une étude plus fine, au cas par cas (sur ligne de production spécifique) pourrait s'envisager. Dans ce cas, les outils proposés en section 3.5.2 seraient utiles pour poser le modèle conceptuel préalable à la quantification. Ce travail spécifique demande des données, de l'expertise et du temps.

De telles études pourraient également permettre de mieux exploiter l'indicateur d'hygiène *Enterobacteriaceae* et d'étudier par exemple le lien, s'il existe, entre les entérobactéries dans l'environnement et *Salmonella* ou *Cronobacter* dans le produit fini. Ces études pourraient être envisagées de façon quantitative, par site, par zone voire même par surface au sein de chaque zone.

**8. En annexe de votre réponse à la saisine relative au plan d'échantillonnage proposé par Lactalis, figurait un programme utilisable avec le logiciel R pour évaluer la performance d'un tel plan. Or, l'utilisation de ce logiciel demande un niveau d'expertise significatif. Pourriez-vous remplir le tableau annexé pour guider les inspecteurs lors de la gestion des non-conformités dans les produits ?**

Les calculs relatifs au plan d'échantillonnage ont été revus et améliorés par rapport à ceux proposés dans le rapport de l'Afssa en 2008. La nouvelle méthode a été détaillée dans la section 3.4, associée à un exemple basé sur des valeurs réalistes de contamination. L'Anses va organiser, selon des modalités à préciser, une mise à disposition ciblée d'un programme R associé à une application Shiny accessible en ligne.

**Plan de surveillance des poudres produites en France**

**9. La production française de lait en poudre infantile a été d'environ 145 000 tonnes en 2016. Combien d'échantillons seraient nécessaires pour être capable de détecter un taux de contamination plus faible d'un facteur 10 que celui couramment observé pour d'autres denrées, soit un taux de contamination de 1 pour 1 000 lots de 5 à 100 tonnes ? Même question si on estime le taux de contamination à 1 pour 10 000 lots ?**

Nous nous plaçons dans le cadre d'un plan national dont l'objectif est de repérer le statut des lots de production. Quel que soit le pourcentage de lots contaminés (1 sur 1000 ou 1 sur 10 000), pour connaître le statut d'un lot, il convient :

- d'analyser chaque lot ;
- de construire un plan d'échantillonnage permettant de connaître le statut de chaque lot (conforme ou non-conforme).

Le nombre de prises d'essai à analyser est détaillé dans la section 3.4.3. Pour chaque lot, il dépend de la densité de contamination et du degré d'hétérogénéité de cette dernière.

---

<sup>12</sup> La conception hygiénique est une obligation en vertu de la Directive 2006/42/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 mai 2006 relative aux machines et modifiant la directive 95/16/CE, Annexe 1, Section 2.1. *Machines destinées à l'industrie alimentaire et machines destinées à l'industrie cosmétique ou pharmaceutique.*



**10. Le règlement (CE) n°2073/2005 impose d'analyser 30 échantillons de 25 g par lot. Quelle serait la différence de performance entre des plans consistant à prélever :**

- 25 g dans 30 boîtes différentes d'un même lot,
- 6 x 25 g soit 150 g dans 5 boîtes d'un même lot,
- 30 x 25 g soit 750 g dans une seule boîte du lot ? »

À condition que l'échantillonnage soit aléatoire et que la répartition de la contamination soit parfaitement homogène, les trois plans sont équivalents sous réserve que toutes les prises d'essai soient individuellement analysées. Pour le cas où la répartition de la contamination n'est pas homogène, la réponse à cette question dépend de la répartition des bactéries.

## 5. CONCLUSIONS DU CES BIORISK ET DU GROUPE DE TRAVAIL

*Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. sont les principaux dangers microbiologiques dont la maîtrise est jugée essentielle pour la sécurité des préparations en poudre pour nourrissons. La liste de dangers devrait être reconsidérée par les producteurs de préparation en poudre pour nourrissons à chaque évolution de formulation ou de procédé et au regard de nouvelles données épidémiologiques.

La sécurité des préparations en poudre pour nourrissons est principalement assurée par la mise en œuvre des bonnes pratiques d'hygiène et de l'application des principes HACCP. Les plans d'échantillonnage pour l'analyse microbiologique qui ciblent le produit fini n'ont pas pour vocation de pallier les défaillances dans l'application des PRP et du système HACCP. Le contrôle par échantillonnage du produit fini n'est pas en soi une mesure de maîtrise. En effet, pour des raisons statistiques, quand la contamination microbienne est faible (ce qui est bien entendu souvent le cas), il faut prélever et analyser un nombre irréaliste de prises d'essai pour obtenir une information pertinente. Cependant, à l'inverse, lorsque l'on détecte *Salmonella* spp. ou *Cronobacter* spp. dans un lot, des actions doivent être mises en place et adaptées au risque encouru par la population destinataire du produit, c'est pourquoi les plans d'échantillonnage restent nécessaires.

L'information recueillie lors de l'échantillonnage du produit fini d'un lot donné n'apporte qu'une information sur ce lot. Il serait plus intéressant d'analyser globalement les données issues de l'échantillonnage à l'échelle de la ligne de production, voire même de l'usine sur une période longue (une année par ex.). Les critères microbiologiques de sécurité qui définissent l'acceptabilité d'un lot de denrées alimentaires pourraient être judicieusement remplacés par la mise en place d'un objectif de performance (ou PO - *Performance Objective*, niveau maximal de contamination microbiologique acceptable à un stade antérieur à la consommation du produit p. ex. au stade de la sortie usine).

En revanche, la détection et le dénombrement des bactéries pathogènes ou des indicateurs d'hygiène dans des prélèvements environnementaux réalisés selon un plan d'échantillonnage judicieux, associé à l'application et au respect du zonage de l'usine, contribuent de manière significative à une gestion préventive du risque sanitaire. Les analyses microbiologiques environnementales sont essentielles. Elles permettent :

- de détecter une contamination de l'environnement par un pathogène,
- d'établir un niveau de référence des critères d'hygiène acceptable en-dessous duquel l'environnement est considéré comme maîtrisé, et au-delà duquel des actions correctives sont nécessaires,
- d'évaluer si ce niveau de référence est dépassé ou non,
- de rechercher les sources de contamination par un pathogène, quand il y a eu par ex. des échantillons positifs dans le produit fini, afin d'appliquer les actions correctives adéquates.

Une stratégie d'échantillonnage (fréquence, nombre de prises d'essai, lieux de prélèvements) ne peut être recommandée de façon générale car spécifique de chaque usine et ligne de production. Quelques exemples sont donnés par le groupe de travail à visée d'illustration.

En cas de détection d'une bactérie pathogène dans l'environnement ou dans le produit fini, une recherche de cause est essentielle. Le recours à une cartographie des flux et transferts dans l'usine (produits, personnel, aérosol), adossée à la construction de diagrammes de causalité est proposée pour faciliter la recherche de l'origine de la contamination et à mettre en place les actions correctives appropriées. Cette cartographie qui vise à repérer les flux de matière ou d'air au sein de l'usine pouvant entraîner une contamination du produit fini peut être bâtie en réaction (quand le pathogène a été repéré), mais le groupe de travail recommande de la bâtir de façon préventive en dehors des périodes de crise. Les méthodes de

biologie moléculaire de type séquençage du génome entier sont également des outils intéressants pour l'identification des sources de contamination au sein d'ateliers de production.

Une analyse systématique des données d'autocontrôles microbiologiques relatifs aux indicateurs d'hygiène (*Enterobacteriaceae*) est recommandée pour établir un niveau de référence et repérer, par suivi des courbes de tendance, la moindre dérive susceptible d'entraîner un risque accru pour le consommateur. Les données de dénombrement des indicateurs d'hygiène sont également utiles pour construire la cartographie des flux. Leur présence en quantité plus ou moins élevée en différents lieux de l'environnement, voire dans le produit fini, renseigne sur la vraisemblance d'un transfert.

La partie analytique du plan d'échantillonnage n'est pas à négliger : les modalités d'échantillonnage, de prélèvements et de mise en analyse impactent les résultats du plan, en particulier une bonne connaissance des limites des techniques actuelles utilisées dans la recherche de *Salmonella* et *Cronobacter* dans les préparations en poudre pour nourrissons et un suivi des travaux de recherche dans ce domaine sont souhaitables. La traçabilité des informations relative aux modalités d'échantillonnage, de prélèvements et de mise en analyse devrait être assurée, qu'il s'agisse d'échantillons de l'environnement ou de produits finis.

Les principales mesures de maîtrise semblent connues des entreprises ayant communiqué leur PMS. Cependant, à la lecture des PMS, les mesures classées en points faibles ou à approfondir devraient faire l'objet d'une attention particulière lors des inspections. L'analyse et la maîtrise des dangers liés aux préparations en poudre pour nourrissons pourrait être facilitée par la rédaction d'un Guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP (GBPH). Le groupe de travail encourage vivement les opérateurs à rédiger un tel document.

En parallèle, il est important de rappeler la nécessité de respecter les mesures d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons (AFSSA 2005).

Des pistes de recherche ont été identifiées. En particulier, il serait nécessaire de :

- produire les connaissances sur les méthodes de prélèvement et de mise en analyse des *Salmonella* et *Cronobacter* provenant d'un environnement sec afin de mieux quantifier le niveau de contamination dans l'usine ou dans le produit fini ;
- produire les connaissances et développer les modèles de transferts adéquats dans l'objectif d'établir un lien quantitatif entre les probabilités d'une contamination récurrente dans l'environnement et d'une contamination de produit fini.

Enfin, les différentes auditions et discussions avec les experts ont pointé un besoin de formation. Celle-ci, organisée de façon régulière, permettrait aux acteurs de terrain (inspecteurs vétérinaires et opérateurs dans les usines) et aux autorités compétentes d'uniformiser leurs connaissances, de relativiser le pouvoir du « tout échantillonnage » et de s'approprier de nouveaux outils de la gestion du risque tel que l'objectif de performance.

## 6. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du CES BIORISK et du GT « Poudres infantiles ».

La présente expertise a été menée à la demande de la Direction générale de l'alimentation à la suite de la contamination de lots de produits de la société Lactalis ayant conduit à une épidémie de cas de salmonellose affectant les nourrissons. Elle visait à prendre du recul par rapport au traitement de cet événement marquant en menant une analyse globale des éléments qui participent à la maîtrise des risques et en actualisant le précédent avis de l'Afssa (2008) qui faisait référence.

Tout d'abord, l'Anses souligne qu'il n'existe pas – contrairement à de nombreuses filières de l'industrie alimentaire – de guide commun de bonnes pratiques d'hygiène et des principes HACCP pour la filière des préparations en poudre pour les nourrissons.

L'Agence rappelle que les préparations en poudre pour nourrissons sont des produits transformés qui passent par de nombreuses étapes de production et peuvent être contaminées à différents stades de l'élaboration par des bactéries présentes dans l'environnement de l'usine. Une étape de pasteurisation en cours de processus permet l'élimination des éventuelles contaminations en amont de celle-ci. Pour ce qui se passe entre la pasteurisation et l'emballage final, la garantie d'absence de bactéries pathogènes dépend de multiples actions concourant à maintenir un environnement non propice au développement de ces bactéries et aussi d'une organisation du procédé de fabrication évitant leur transfert vers le produit.

Après avoir passé en revue l'application des fondamentaux de l'analyse des dangers, des points critiques pour leur maîtrise (HACCP) à cette filière, l'expertise mise en œuvre a précisé les points d'attention pour une maîtrise de ces risques avec un haut niveau de garanties, qui passe par l'implémentation de programmes permettant la compréhension du comportement des bactéries et leur suivi dans l'environnement propre à chaque installation. L'expertise a permis de mettre en évidence l'importance de mesures de prévention graduées en fonction du stade d'élaboration, en particulier après la pasteurisation, et d'une vigilance sur les changements de zone de travail (avant conditionnement par ex.).

L'expertise a de plus montré, par différentes simulations, que les contrôles sur produits finaux ne constituent pas une mesure qui permet d'apporter à elle seule la garantie de sécurité des produits finis. Ils restent cependant un complément des mesures d'hygiène et de prévention, en tant qu'outil de vérification de l'efficacité du système HACCP.

Ainsi, cette expertise apporte, tant à la DGAL qu'aux industriels, chacun dans leurs responsabilités propres, des outils de réflexion et des recommandations pour améliorer les mesures de maîtrise des risques, pouvant aller jusqu'à des outils très opérationnels en appui à l'inspection des sites.

Enfin, l'Anses encourage vivement la filière à élaborer un guide commun sur les bonnes pratiques d'hygiène et des principes HACCP appliqués à la production des préparations en poudre pour nourrissons.

Dr Roger Genet

## MOTS-CLES

Préparations en poudre pour nourrissons ; *Salmonella* ; *Cronobacter* ; HACCP ; Echantillonnage.

*Powdered infant formula* ; *Salmonella* ; *Cronobacter* ; HACCP ; *Sampling*.

**BIBLIOGRAPHIE****PUBLICATIONS**

- ABC, (Almond Board of California). s.d. "Pathogen Environmental Monitoring Program (PEM) " Consulté le 11 mars 2019. [http://www.almonds.com/sites/default/files/content/attachments/pem\\_book.pdf](http://www.almonds.com/sites/default/files/content/attachments/pem_book.pdf).
- AFSSA. 2005. *Recommandations d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons - Hygiene recommendations for the preparation, handling and storage of feeding bottles*. Edité par C Bultel et D Turck. Maisons-Alfort (France): Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- AFSSA. 2008. *Contamination microbienne des préparations lactées en poudre destinées aux nourrissons et personnes âgées*. Maisons-Alfort: Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Allard, M. W., R. Bell, C. M. Ferreira, N. Gonzalez-Escalona, M. Hoffmann, T. Muruvanda, A. Ottesen, P. Ramachandran, E. Reed, S. Sharma, E. Stevens, R. Timme, J. Zheng, et E. W. Brown. 2018. "Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety." *Curr Opin Biotechnol* 49:224-229. doi: 10.1016/j.copbio.2017.11.002.
- ANSES. 2014. *Suivi de la réalisation et de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des surfaces, des matériels et des locaux - Fiche-outil pour un guide des bonnes pratiques d'hygiène*. Maisons-Alfort: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- ANSES. 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. Maisons-Alfort: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- Barron, JC, et SJ Forsythe. 2007. "Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula." *Journal of Food Protection* 70 (9):2111-2117.
- Bobal, Martin, Anna Kristina Witte, Patrick Mester, Susanne Fister, Dagmar Schoder, et Peter Rossmanith. 2019. "A novel method for sampling and long-term monitoring of microbes using stickers of plain paper." *Applied and Environmental Microbiology*:AEM. 00766-19.
- Buchanan, R L, et R Oni. 2012. "Use of microbiological indicators for assessing hygiene controls for the manufacture of powdered infant formula." *Journal of Food Protection* 75 (5):989-997.
- CNIEL. 2019. *L'économie laitière en chiffres*. Edité par Centre national interprofessionnel de l'économie laitière. Paris: Centre national interprofessionnel de l'économie laitière.
- Cocolin, L., M. Mataragas, F. Bourdichon, A. Doulgeraki, M. F. Pilet, B. Jagadeesan, K. Rantsiou, et T. Phister. 2018. "Next generation microbiological risk assessment meta-omics: The next need for integration." *Int J Food Microbiol* 287:10-17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.008.
- Cordier, Jean-Louis. 2008. "Production of powdered infant formulae and microbiological control measures." Dans *Enterobacter sakazakii*, edité par Jeffrey M. Farber et Steve J. Forsythe. Washington, DC: ASM Press.
- DGAL, Direction générale de l'alimentation. 2019. Instruction technique DGAL/SDSSA/2019-452 du 13 juin 2019 :Inspection des établissements fabriquant, mélangeant ou conditionnant des poudres de lait ou de produits laitiers infantiles - Plan de prélèvement d'échantillon à réaliser en 2019.
- ECDC, (European Centre for Disease Prevention Control), et (European Food Safety Authority) EFSA. 2019. "Multi-country outbreak of Salmonella Poona infections linked to consumption of infant formula." *EFSA Supporting Publications* 16 (3):1594E. doi: 10.2903/sp.efsa.2019.EN-1594.
- Edelson-Mammel, Sharon G, Mary K Porteous, et Robert L Buchanan. 2005. "Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula." *Journal of Food Protection* 68 (9):1900-1902.
- EFSA BIOHAZ Panel, (Efsa Panel on Biological Hazards). 2015. "Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk." *EFSA Journal* 13 (1):3940. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3940.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2007. "Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the request for review of the opinion on microbiological risks in infant formulae and

- follow-on formulae with regard to Enterobacteriaceae as indicators." *EFSA Journal* 5 (2):444. doi: 10.2903/j.efsa.2007.444.
- Eginton, PJ, J Holah, DG Allison, PS Handley, et P Gilbert. 1998. "Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents." *Letters in Applied Microbiology* 27 (2):101-105.
- EHEDG. 2005. *Guideline 31 - Hygienic engineering of spray dryer and fluid bed plants*. Francfort-sur-le Main (Allemagne): European Hygienic Engineering & Design Group.
- EHEDG. 2014. *Guideline 22 - General hygienic design criteria for the safe processing of dry particulate materials*. Francfort-sur-le-Main (Allemagne): European Hygienic Engineering & Design Group.
- FAO. 2016. "Applications of whole genome sequencing in food safety management." ; .
- FAO/OMS. 2009. *Code d'usages en matière d'hygiène pour le lait et les produits laitiers - CAC/RCP 57-2004 amendé en 2009*. Rome (Italie): Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale pour la santé.
- FAO/WHO. 2002. "Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens." Rome.
- FAO/WHO. 2004. *Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula, Microbiological Assessment Series 6*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization.
- FAO/WHO. 2006. *Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula - Meeting report (FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series No. 10)*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.
- FAO/WHO. 2007. *Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula meeting report, Microbiological risk assessment series 6*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.
- FAO/WHO. 2008. *Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formula, Microbiological Risk Assessment series 15*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization.
- Finn, Sarah, Orla Condell, Peter McClure, Alejandro Amézquita, et Séamus Fanning. 2013. "Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments." *Frontiers in Microbiology* 4:331.
- Forsythe, S. 2018. "Microbial Source Tracking of Cronobacter spp." *Adv Appl Microbiol* 103:49-101. doi: 10.1016/bs.aambs.2018.01.004.
- Forsythe, Stephen J. 2018. "Updates on the Cronobacter Genus." *Annual review of food science and technology* 9 (1):23-44. doi: 10.1146/annurev-food-030117-012246.
- Fouladkhah, A. 2019. Updated list of pathogenic *Cronobacter* outbreaks. Harvard Dataverse, V1: <https://doi.org/10.7910/DVN/TZ5PV9>.
- Gopinath, G. R., H. R. Chase, J. Gangiredla, A. Eshwar, H. Jang, I. Patel, F. Negrete, S. Finkelstein, E. Park, T. Chung, Y. Yoo, J. Woo, Y. Lee, J. Park, H. Choi, S. Jeong, S. Jun, M. Kim, C. Lee, H. Jeong, S. Fanning, R. Stephan, C. Iversen, F. Reich, G. Klein, A. Lehner, et B. D. Tall. 2018. "Genomic characterization of malonate positive Cronobacter sakazakii serotype O:2, sequence type 64 strains, isolated from clinical, food, and environment samples." *Gut Pathog* 10:11. doi: 10.1186/s13099-018-0238-9.
- Gurtler, Joshua B, et Susanne E Keller. 2019. "Microbiological Safety of Dried Spices." *Annual review of food science and technology* 10:409-427.
- Habraken, C.J.M., D.A.A. Mossel, et S. van den Reek. 1986. "Management of *Salmonella* risks in the production of powdered milk products." *Netherlands Milk and Dairy Journal* 40:99-116.
- Hwang, Ji-Yeon, et Jong-Hyun Park. 2015. "Distribution of six exotoxin genes and production of L2-HBL and nheA proteins in six Bacillus cereus isolates from infant formula and produce." *Food Science and Biotechnology* 24 (1):379-382.
- ICMSF. 2002a. *Microorganisms in Foods 7—Microbiological Testing in Food Safety Management*. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. New York: Kluwer Academic/Plenum.

- ICMSF. 2002b. "Salmonella in Dried Milk." Dans *Microbiological Testing in Food Safety Management*, édité par International Commission on Microbiological Specifications for Foods Staff. Boston, MA, : Springer.
- ICMSF. 2018. *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety (2nd ed.)*. Edité par International Commission on Microbiological Specifications for Foods Staff. Cham (Suisse): Springer.
- Iddir, Olivier 2015. "Noeud papillon : une méthode de quantification du risque." *Techniques de l'ingénieur* SE4055 V2.
- InVS, Institut de veille sanitaire. 2009. "Rapport annuel 2008." ; .
- Iversen, C, et S Forsythe. 2004. "Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products." *Food Microbiology* 21 (6):771-777.
- Iversen, C, M Lane, et SJ Forsythe. 2004. "The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk." *Letters in Applied Microbiology* 38 (5):378-382.
- Jacobs, C, P Braun, et P Hammer. 2011. "Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant." *Journal of Dairy Science* 94 (8):3801-3810.
- Jacobs, Wilma, Sjoerd Kuiling, et Kim van der Zwaluw. 2014. "Molecular typing of Salmonella strains isolated from food, feed and animals: state of play and standard operating procedures for pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) typing, profiles interpretation and curation." *EFSA Supporting Publications* 11 (12):703E.
- Jagadeesan, Balamurugan, Peter Gerner-Smidt, Marc W. Allard, Sébastien Leuillet, Anett Winkler, Yinghua Xiao, Samuel Chaffron, Jos Van Der Vossen, Silin Tang, Mitsuru Katase, Peter McClure, Bon Kimura, Lay Ching Chai, John Chapman, et Kathie Grant. 2019. "The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice." *Food Microbiology* 79:96-115. doi: 10.1016/j.fm.2018.11.005.
- Jones, Gabrielle, Maria Pardos de la Gandara, Laura Herrera-Leon, Silvia Herrera-Leon, Carmen Varela Martinez, Roselyne Hureau-Roy, Yasmine Abdallah, Athinna Nisavanh, Laetitia Fabre, Charlotte Renaudat, Joël Mossong, Wesley Mattheus, Cécile Huard, Caroline Le Borgne, Henriette de Valk, François-Xavier Weill, et Nathalie Jourdan-Da Silva. 2019. "Outbreak of Salmonella enterica serotype Poona in infants linked to persistent Salmonella contamination in an infant formula manufacturing facility, France, August 2018 to February 2019." *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 24 (13):1900161. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.13.1900161.
- Jongenburger, I., J. Bassett, T. Jackson, M. H. Zwietering, et K. Jewell. 2012. "Impact of microbial distributions on food safety I. Factors influencing microbial distributions and modelling aspects." *Food Control* 26 (2):601-609. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.02.004.
- Jongenburger, I., M. W. Reij, E. P. Boer, L. G. Gorris, et M. H. Zwietering. 2011. "Actual distribution of *Cronobacter* spp. in industrial batches of powdered infant formula and consequences for performance of sampling strategies." *Int J Food Microbiol* 151 (1):62-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.003.
- Jongenburger, I., M. W. Reij, E. P. Boer, M. H. Zwietering, et L. G. Gorris. 2012. "Modelling homogeneous and heterogeneous microbial contaminations in a powdered food product." *Int J Food Microbiol* 157 (1):35-44. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.009.
- Jourdan-da-Silva, Nathalie, Laetitia Fabre, Eve Robinson, Nelly Fournet, Athinna Nisavanh, Mathias Bruyand, Alexandra Mailles, Estelle Serre, Magali Ravel, et Véronique Guibert. 2018. "Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017." *Eurosurveillance* 23 (2).
- Jourdan, N, S Le Hello, G Delmas, J Clouzeau, C Manteau, B Désaubliaux, V Chagnon, F Thierry-Bled, N Demare, et FX Weill. 2008. "Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype Give infections in infants in France, linked to infant milk formula, September 2008." *Eurosurveillance* 13 (39):18994.
- Kent, Robert, Gerald Fitzgerald, Colin Hill, Catherine Stanton, et R Ross. 2015. "Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula." *Nutrients* 7 (2):1217-1244.

- Kim, Hoikyung, Jee-Hoon Ryu, et Larry R Beuchat. 2007. "Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (4):1256-1265.
- Kovac, Jasna, Henk den Bakker, Laura M. Carroll, et Martin Wiedmann. 2017. "Precision food safety: A systems approach to food safety facilitated by genomics tools." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 96:52-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.06.001>.
- Lang, E., F. Zoz, C. Iaconelli, S. Guyot, P. Alvarez-Martin, L. Beney, J. M. Perrier-Cornet, et P. Gervais. 2016. "Recovery Estimation of Dried Foodborne Pathogens Is Directly Related to Rehydration Kinetics." *PloS one* 11 (8):e0160844. doi: 10.1371/journal.pone.0160844.
- March, DA. 2011. "Dry foods for infants and young children." Dans *Microorganisms in foods 8*, édité par KMJ Swanson, RL Buchanan, MB Cole, JL Cordier, TS Flowers, LGM Gorris, MH Taniwaki et RB Tompkin. New York: Springer.
- Mellmann, Alexander, Dag Harmsen, Craig A Cummings, Emily B Zentz, Shana R Leopold, Alain Rico, Karola Prior, Rafael Szczepanowski, Yongmei Ji, et Wenlan Zhang. 2011. "Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology." *PloS one* 6 (7):e22751.
- Midelet, G, et B Carpentier. 2002. "Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8):4015-4024.
- Muytjens, Harry L, HANNIE Roelofs-Willemse, et GH Jaspar. 1988. "Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*." *Journal of Clinical Microbiology* 26 (4):743-746.
- Nazarowec-White, M, et JM Farber. 1997. "Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula." *Letters in Applied Microbiology* 24 (1):9-13.
- OPX. 2014. *One Voice for Hygienic Equipment Design for Low-Moisture Foods*. Vol. B155 TR3. Reston (Virginie): PMMI and NSF International,.
- Oulahal-Lagsir, N, A Martial-Gros, E Boistier, LJ Blum, et M Bonneau. 2000. "The development of an ultrasonic apparatus for the non-invasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment." *Letters in Applied Microbiology* 30 (1):47-52.
- Oulahal-Lagsir, Nadia, Adele Martial-Gros, Marc Bonneau, et Loic J. Blum. 2003. "'*Escherichia coli*-milk" biofilm removal from stainless steel surfaces: Synergism between ultrasonic waves and enzymes." *Biofouling* 19 (3):159-168. doi: 10.1080/08927014.2003.10382978.
- Peighambardoust, S. H., A. Golshan Tafti, et J. Hesari. 2011. "Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review." *Trends in Food Science & Technology* 22 (5):215-224. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.009>.
- Pightling, A. W., J. B. Pettengill, Y. Luo, J. D. Baugher, H. Rand, et E. Strain. 2018. "Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations." *Front Microbiol* 9:1482. doi: 10.3389/fmicb.2018.01482.
- Podolak, R., & Black, D. G. (Eds.). 2017. *Control of Salmonella and other bacterial pathogens in low-moisture foods*: John Wiley & Sons.
- Podolak, Richard, Elena Enache, Warren Stone, Darryl G Black, et Philip H Elliott. 2010. "Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods." *Journal of Food Protection* 73 (10):1919-1936.
- RASFF. 2019. Système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Dans [https://ec.europa.eu/food/safety/rasff/portal\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/rasff/portal_en).
- Rodríguez-Urrego, J, S Herrera-León, A Echeita-Sarriondia, Pilar Soler, F Simon, et S Mateo. 2010. "Nationwide outbreak of *Salmonella* serotype Kedougou associated with infant formula, Spain, 2008." *Eurosurveillance* 15 (22):19582.
- Schurch, A. C., S. Arredondo-Alonso, R. J. L. Willems, et R. V. Goering. 2018. "Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches." *Clin Microbiol Infect* 24 (4):350-354. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.016.
- Teunis, P FM, F Kasuga, A Fazil, I D Ogden, O Rotariu, et NJC Strachan. 2010. "Dose-response modeling of *Salmonella* using outbreak data." *International Journal of Food Microbiology* 144 (2):243-249.

- Valero, A., F. Pasquali, A. De Cesare, et G. Manfreda. 2014. "Model approach to estimate the probability of accepting a lot of heterogeneously contaminated powdered food using different sampling strategies." *Int J Food Microbiol* 184:35-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.032.
- van Asselt, E. D., H. J. van der Fels-Klerx, H. J. P. Marvin, H. van Bokhorst-van de Veen, et M. Nierop Groot. 2017. "Overview of Food Safety Hazards in the European Dairy Supply Chain." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (1):59-75. doi: 10.1111/1541-4337.12245.
- Veulemans, A, E Jacquain, et D Jacquain. 1970. "Etude d'une méthode simple pour la détermination du degré de pollution des surfaces et la comparaison du pouvoir désinfectant de divers produits d'entretien." *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires* 25:58-65.
- Yang, X., N. R. Noyes, E. Doster, J. N. Martin, L. M. Linke, R. J. Magnuson, H. Yang, I. Geornaras, D. R. Woerner, K. L. Jones, J. Ruiz, C. Boucher, P. S. Morley, et K. E. Belk. 2016. "Use of Metagenomic Shotgun Sequencing Technology To Detect Foodborne Pathogens within the Microbiome of the Beef Production Chain." *Appl Environ Microbiol* 82 (8):2433-2443. doi: 10.1128/aem.00078-16.
- Zoz, F., C. Grandvalet, E. Lang, C. Iaconelli, P. Gervais, O. Firmesse, S. Guyot, et L. Beney. 2017. "Listeria monocytogenes ability to survive desiccation: Influence of serotype, origin, virulence, and genotype." *Int J Food Microbiol* 248:82-89. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.010.
- Zoz, Fiona. 2016. "Impact des fluctuations de l'humidité relative de l'air sur la survie de *Listeria monocytogenes* : application à l'amélioration de l'hygiène dans les ateliers de production alimentaire." Thèse, Université Bourgogne-Franche Comté.
- Zwietering, Marcel H, Liesbeth Jacxsens, Jeanne-Marie Membré, Maarten Nauta, et Mats Peterz. 2016. "Relevance of microbial finished product testing in food safety management." *Food Control* 60:31-43.

## **NORMES**

- NF EN ISO 16140-1:2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 1 : vocabulaire
- 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 17025:2017 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais
- NF EN ISO 18593 :2018. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthodes horizontales pour les prélèvements de surface
- NF EN ISO 21528-1 :2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale par la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* - Partie 1 : recherche des *Enterobacteriaceae*
- NF EN ISO 21528-2 :2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* - Partie 2 : technique par comptage des colonies
- NF EN ISO 22000 :2018. Systèmes de management de la sécurité des denrées alimentaires - Exigences pour tout organisme appartenant à la chaîne alimentaire
- 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.
- 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 7218. Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations
- NF EN ISO 7218/A1. Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations - Amendement 1



NF EN ISO 7932 :2005. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs - Technique par comptage des colonies à 30 °C

NF V01-002 :2015. Tracabilité et sécurité des aliments - Management et hygiène - Hygiène des aliments - Glossaire Français - Anglais

NF V08-054. Microbiologie des aliments - Dénombrement des entérobactéries présumées par comptage des colonies à 30 °C ou à 37 °C

## ANNEXE 1 : PRESENTATION DES INTERVENANTS

**PRÉAMBULE :** Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

### GROUPE DE TRAVAIL

---

#### Président

Mme Jeanne-Marie MEMBRÉ – INRA. Appréciation quantitative du risque microbiologique, statistiques appliquées

#### Membres

M. Mickaël BONI – Ministère des armées – Sécurité sanitaire des aliments, eau potable, microbiologie, analyse des dangers biologiques

M. Bernard CARON – INOVALYS - Microbiologie, hygiène et sécurité des aliments, réglementation, zoonoses, HACCP.

M. Olivier CERF – Professeur émérite, École nationale vétérinaire d'Alfort - Évaluation des risques microbiologiques, microbiologie des aliments

M. Steven DURET – Irstea. Modélisation, génie des procédés, transfert thermique

M. Renaud LAILLER – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments. Surveillance, *Salmonella*, hygiène des aliments

Mme Stéphanie BOUGEARD – Anses, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané. Statistiques

### RAPPORTEURS

---

M. Philippe DANTIGNY – LUBEM Brest. Moisissures, mycotoxines, génie des procédés

M. Michel FEDERIGHI – ONIRIS. Microbiologie, hygiène et qualité des aliments, analyse des dangers

M. Michel GAUTIER – Agrocampus Ouest. Microbiologie et hygiène des aliments, biologie moléculaire, bactériophages, aliments fermentés

### COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

---

Les travaux ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

#### ■ CES « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (BIORISK)

#### Président

M. Philippe FRAVALO – Université de Montréal. Hygiène et microbiologie des aliments (filières avicoles et porcines), méthodes de détection, de quantification et de caractérisation des micro-organismes, Écologie des écosystèmes microbiens en agro-alimentaire

#### Membres

Frédéric AUVRAY – ENVT. Biologie moléculaire, génétique microbienne, bactériologie

M. Frédéric CARLIN – INRA. Bactéries sporulées, produits végétaux, microbiologie prévisionnelle

Mme Catherine CHUBILLEAU – Centre hospitalier de Niort. Epidémiologie, évaluation des risques sanitaires, hygiène

M. Philippe DANTIGNY – LUBEM Brest. Moisissures, mycotoxines, génie des procédés

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – AgroParisTech. Microbiologie des aliments, biofilms, mécanismes d'adaptation des microorganismes au stress (conservateurs, désinfectants)

M. Steven DURET – Irstea. Modélisation, génie des procédés, transfert thermique

M. Michel FEDERIGHI – ONIRIS. Microbiologie, hygiène et qualité des aliments, analyse des dangers

M. Michel GAUTIER – Agrocampus Ouest. Microbiologie et hygiène des aliments, biologie moléculaire, bactériophages, aliments fermentés

Mme Malika GOUALI – Institut Pasteur. Microbiologie de l'eau et des aliments, méthodes de détection, de quantification et de caractérisation des micro-organismes, validation des méthodes

M. Laurent GUILLIER – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments. Modélisation, appréciation quantitative des risques, écologie microbienne, génomique (démission le 15 juin 2019)

M. Stéphane GUYOT – AgroSup Dijon. Procédés de destruction des bactéries pathogènes, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux

Mme Nathalie JOURDAN-DA SILVA – Santé publique France. Épidémiologie des maladies entériques et zoonoses

M. Renaud LAILLER – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments. Surveillance, *Salmonella*, hygiène des aliments

M. Alexandre LECLERCQ – Institut Pasteur. Microbiologie des aliments (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*), méthodes phénotypiques et moléculaires (démission le 10 avril 2019)

Mme Sandra MARTIN-LATIL – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments. Virologie, méthodes de détection

Mme Florence MATHIEU – Toulouse-INP/ENSAT. Moisissures et mycotoxines, microbiologie des aliments

Mme Jeanne-Marie MEMBRÉ – INRA. Appréciation quantitative du risque microbiologique, statistiques appliquées

M. Eric OSWALD – CHU Toulouse. Infectiologie clinique, écologie microbienne, *E. coli*

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Université Montpellier. Mycologie, écologie microbienne, biotechnologie

Mme Nalini RAMA RAO – INRA. Microbiologie, interaction hôte/pathogène, microbiote intestinal

Mme Régine TALON – INRA. Microbiologie des aliments, écologie microbienne, aliments fermentés d'origine animale

Mme Muriel THOMAS – INRA. Microbiote intestinal et santé humaine, physiologie

Mme Isabelle VILLENA – CHU Reims. Parasitologie, infectiologie

## **PARTICIPATION ANSES**

---

La coordination scientifique du projet a été assurée par l'Unité d'Évaluation des Risques liés aux Aliments (UERALIM) sous la direction de M. Moez SANAA (chef d'unité) et Mme Nathalie ARNICH (adjointe au chef d'unité).

### **Coordination scientifique**

Mme Pauline KOOH – Chef de projets scientifiques et techniques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

M. Thomas MAIGNIEN – Chargé de projets scientifiques et techniques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

**Secrétariat administratif**

Mme Angélique LAURENT – Direction de l'Évaluation des Risques

**AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES**

---

M. Stéphane GUYOT – AgroSup Dijon. Procédés de destruction des bactéries pathogènes, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux

M Gilles SALVAT – Anses, directeur de la santé et du bien-être animal, directeur général délégué pour la recherche et la référence

M. Matthieu MOURER – Chef du bureau des établissements de transformation et de distribution (DGAL/SA/SDSSA)

M. Frédéric BERTASSI – Référent National lait et produits laitiers (DGAL)

M. Franck LOUVET – Inspecteur vétérinaire (DDPP Calvados)

Mme. Valérie KROELY-GARIN – Chef de service (DDPP Saône-et-Loire)

Mme Agnès BONNETAIN – Technicienne (DDPP Saône-et-Loire)

Mme Fanny TENENHAUS-AZIZA – CNIEL, Chef de projet AQR

## ANNEXE 2 : DEFINITIONS

*Les définitions données ci-dessous ont été rédigées par le groupe de travail. Elles tiennent compte des évolutions en cours pour la révision des Principes généraux d'hygiène des aliments du Comité du Codex alimentarius pour l'hygiène des aliments (CCFH).*

**Action corrective** : toute action prise en cas d'écart afin de rétablir la maîtrise, déterminer s'il y a lieu le devenir du produit affecté et réduire la probabilité d'une répétition de cet écart.

Note : La norme NF EN ISO 22000 distingue les actions qui visent le devenir du produit (qu'elle nomme corrections) des actions qui ont pour but la recherche des causes des déviations et d'éviter leur récurrence.

**Analyse des dangers** : le processus consistant à réunir et à évaluer les informations sur les dangers identifiés dans l'environnement, dans le procédé ou dans l'aliment, et sur les conditions qui conduisent à leur présence, afin de décider si certains sont significatifs ou pas.

**Bonnes pratiques d'hygiène (BPH)** : pratiques et conditions fondamentales appliquées à toutes les étapes de la chaîne alimentaire visant spécifiquement la sécurité sanitaire et la salubrité des aliments.

Note : Dans le cas où le système HACCP n'est pas appliqué et où seules des BPH sont utilisées, il peut être nécessaire de porter une attention particulière à certaines d'entre elles.

**Contrôle** : dans le présent texte, ce mot concerne essentiellement les analyses microbiologiques des ingrédients, du produit fini ou de l'environnement de fabrication, pour détecter les contaminants microbiologiques, ou déterminer leur nature et/ou leur niveau.

**Danger** : agent biologique, chimique ou physique dans ou état de l'aliment ayant potentiellement un effet préjudiciable à la santé

Note : Par état de l'aliment, on entend la température trop élevée ou trop basse, ou la présence d'éléments solides pouvant provoquer l'étouffement.

**Danger significatif** : danger identifié comme étant raisonnablement susceptible de survenir à un niveau inacceptable et dont la maîtrise est essentielle, compte tenu de l'usage prévu pour le produit.

**Échantillon** : ensemble des prises d'essai prélevées lors de l'échantillonnage.

**Échantillonnage** : sélection d'une ou plusieurs prises d'essai dans un lot d'aliment, de telle sorte que les prises d'essai sélectionnées soient représentatives de ce lot.

**Limite critique** : un critère qui sépare l'acceptabilité de l'inacceptabilité.

**LOD<sub>50</sub> (d'une méthode d'analyse)** : concentration en ufc dans une masse de produit définie qui est détectée dans 50 % des cas (et donc qui n'est pas détectée dans 50 % des cas). La valeur de la LOD<sub>50</sub> est toujours assortie de son intervalle de confiance.

**Lot** : ensemble d'unités de vente d'une denrée alimentaire - homogène et de formulation stable - produite, fabriquée ou conditionnée dans des circonstances pratiquement identiques.

**Mesure de maîtrise** : toute intervention ou activité à laquelle on peut avoir recours pour prévenir ou éliminer un danger ou pour le ramener à un niveau acceptable.

Note : Les PRP comportent des mesures de maîtrise de portée générale, tandis que les mesures de maîtrise du système HACCP ciblent les dangers significatifs identifiés par l'analyse des dangers.

**Nourrissons** : un enfant âgé de moins de 12 mois (Règlement (UE) n° 609/2013).

**Plan de maîtrise sanitaire (PMS)** : outil mis en place par les professionnels et décrivant les mesures prises pour assurer l'hygiène et la sécurité sanitaire des aliments produits. Il doit être constitué (1) de prérequis ou bonnes pratiques d'hygiène (BPH), (2) de procédures fondées sur les 7 principes de l'HACCP et (3) de procédures de traçabilité et de gestion des non-conformités (Note de service DGAL/SDSSA/N2012-8156 du 24 juillet 2012).

**Point critique pour la maîtrise (CCP) :** étape de production où une ou des mesures de maîtrise, essentielles contre un danger significatif, sont appliquées dans un système HACCP.

Note 1 : Dans les Principes généraux d'hygiène des aliments du *Codex alimentarius*, les CCP sont par définition les étapes où sont appliquées les mesures de maîtrise des dangers significatifs, quel que soit leur mode de surveillance. De même, dans le *vade-mecum* général de la DGAL, les points déterminants regroupent tous les types de mesures de maîtrise des dangers significatifs (DGAL 2017)

Note 2 : On distingue deux types de mesures de maîtrise des dangers significatifs :

- celles dont la surveillance se fait au moyen de grandeurs mesurables, et d'une ou plusieurs limites critiques pour ces grandeurs. En cas de non-respect des limites critiques, détecté en temps réel, le produit est automatiquement considéré comme potentiellement préjudiciable à la santé. Selon NF EN ISO 22000, seules les mesures de maîtrise de ce type sont appliquées à des CCP ;
- celles pour la surveillance desquelles on ne dispose pas d'une grandeur mesurable mais seulement d'une consigne d'action ou d'une observation, ou bien on dispose d'une grandeur mesurable mais on ne peut pas la surveiller en continu, ou bien on ne peut pas surveiller chaque lot en cas de fabrication par lot. En cas de non-respect, une décision doit être prise au cas par cas pour déterminer si le lot ou une partie du lot est potentiellement préjudiciable à la santé. Selon NF EN ISO 22000, les mesures de maîtrise de ce type ne sont pas appliquées à des CCP et on les nomme Programmes prérequis opérationnel (PRPO).

Le degré de gravité des conséquences pour la santé dicte le choix et l'intensité des mesures de maîtrise des dangers significatifs.

Le choix de classer une mesure de maîtrise spécifique en CCP ou PRPO n'est dicté que par le mode de surveillance, pas par le degré de gravité des conséquences pour la santé : cela est clarifié dans NF EN ISO 22000:2018.

Note 3 : Pour information, les mesures de maîtrise des dangers significatifs sont nommées « *preventive controls* » dans la nouvelle législation des États-Unis d'Amérique.

**Point d'accumulation :** point à l'intérieur ou à l'extérieur des équipements où des bactéries indésirables peuvent s'accumuler et persister, et où elles peuvent former des biofilms si l'humidité est suffisante.

**Préparation pour nourrissons :** une denrée alimentaire destinée à être utilisée par des nourrissons pendant les premiers mois de leur vie et qui répond à elle seule aux besoins nutritionnels de ces nourrissons jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée (Règlement (UE) n° 609/2013).

**Prise d'essai :** quantité (volume ou masse) d'aliment prélevée par le laboratoire et analysée.

**Programme prérequis opérationnel (PRPO) (NF EN ISO 22000:2018) :** mesure de maîtrise ou combinaison de mesures de maîtrise appliquée pour prévenir l'apparition d'un danger significatif lié à la sécurité des denrées alimentaires ou pour le ramener à un niveau acceptable, et où un critère d'action et une mesure ou une observation permettent une maîtrise efficace du processus et/ou du produit.

Note 1 : Cette expression est critiquée, car un programme prérequis opérationnel (PRPO) n'est pas un programme prérequis (PRP) : en effet, il s'applique à un processus où des PRP sont pré-établis.

Note 2 : Ce concept n'est pas utilisé par le *Codex alimentarius* dans les Principes généraux d'hygiène des aliments, et, selon toute probabilité, ne le sera pas davantage dans le texte en cours de révision.

Note 3 : Les points critiques pour la maîtrise (CCP) et les programmes prérequis opérationnels (PRPO) au sens de la norme NF EN ISO 22000:2018 constituent les points déterminants dans le *vade-mecum* général de la DGAL.

**Programmes prérequis (PRP) :** programmes incluant les BPH, les bonnes pratiques agricoles (BPA) et les bonnes pratiques vétérinaires ainsi que d'autres pratiques et procédures telles que la formation et la traçabilité, instaurant les conditions environnementales et opérationnelles de base qui établissent les fondements de la mise en œuvre d'un système HACCP.

Note 1 : Dans le contexte de l'hygiène des aliments, les PRP à prendre en considération sont ceux qui contribuent à la sécurité et à la salubrité en limitant ou en réduisant la charge microbiologique globale :

bonnes pratiques agricoles, bonnes pratiques vétérinaires, bonnes pratiques de fabrication, bonnes pratiques d'hygiène. Les mesures de maîtrise identifiées lors de l'analyse des dangers (qui tient compte de l'effet des PRP) ne visent que la sécurité en ciblant un ou des dangers spécifiés, identifiés comme significatifs par cette analyse.

Note 2 : Pour information, les PRP font partie des « *good manufacturing practices* » dans la nouvelle législation des États-Unis d'Amérique.

**Sensibilité** : capacité de la méthode de référence ou de la méthode alternative à détecter l'analyte (NF EN ISO 16140-1:2016) (capacité, exprimée en %, de la méthode à donner un résultat positif lorsque l'échantillon est contaminé).

**Spécificité** : capacité de la méthode de référence ou de la méthode alternative à ne pas détecter l'analyte (NF EN ISO 16140-1:2016) (capacité, exprimée en %, de la méthode à donner un résultat négatif lorsque l'échantillon est non contaminé).

**Surveiller** : procéder à une série programmée d'observations ou de mesurages des critères de maîtrise afin de s'assurer qu'une mesure de maîtrise est appliquée correctement.

**Taille d'échantillon (n)** : nombre de prises d'essai prélevées lors de l'échantillonnage.

**Validation** : obtention de preuves qu'une mesure de maîtrise ou une combinaison de mesures de maîtrise, correctement mise en œuvre, est capable de maîtriser un danger en atteignant un résultat spécifié.

**Vérification** : application de méthodes, procédures, tests et autres évaluations, en plus de la surveillance, afin de déterminer si une mesure de maîtrise fonctionne ou a fonctionné comme prévu.

**Zone d'hygiène définie** (zone en abrégé) : aire délimitée d'une usine et de ses abords où l'on applique des pratiques d'hygiène de niveau défini.

Note 1 – Dans le présent rapport, quatre zones sont considérées :

- zone 1 (souvent dite de très haute hygiène) : zones où les produits sont manipulés et exposés à l'environnement de production sans étape ultérieure de traitement thermique / réduction du danger (p.ex. zone sèche) ;
- zone 2 (souvent dite de haute hygiène) : zones où les produits peuvent être ponctuellement exposés à l'environnement de production avec une étape ultérieure de traitement thermique / réduction de danger (p.ex. mélangeage des ingrédients) ;
- zone 3 (souvent dite d'hygiène intermédiaire) : zones en contact avec l'extérieur, où les produits sont protégés et manipulés sans être exposés à l'environnement de production (p.ex. salle d'expédition) ;
- zone 4 (d'hygiène de base) : quais de déchargement des matières premières, vestiaires du personnel, cafétéria, extérieur des bâtiments.

Note 2 : À l'intérieur des zones, les précautions à prendre et les BPH ou les mesures de maîtrise dépendent de la proximité des surfaces avec le produit. On distingue :

- les surfaces en contact avec le produit (p. ex. parois internes des équipements, mains des opérateurs, tapis convoyeurs, intérieur des contenants) ;
- les surfaces proches mais sans contact (p. ex. parois externes des équipements, supports des équipements, tenues des opérateurs) ;
- les surfaces éloignées (p. ex. murs, sols, caniveaux, plafonds, chariots).

### **ANNEXE 3 : REGLEMENTATION SUR LES PLANS DE MAITRISE SANITAIRE**

Dans le cadre de l'arrêté du 8 juin 2006 relatif à l'agrément sanitaire des établissements mettant sur le marché des produits d'origine animale ou des denrées contenant des produits d'origine animale, les entreprises doivent déposer une demande d'agrément. Pour que la demande soit recevable, elle doit être accompagnée d'un dossier comprenant les documents descriptifs de l'établissement et le plan de maîtrise sanitaire, notamment fondé sur les principes de l'HACCP, tels que définis dans l'annexe 2 de l'arrêté.

Ce dossier doit contenir :

- 1) une présentation de l'entreprise
- 2) une description des activités de l'entreprise
- 3) le plan de maîtrise sanitaire (PMS)

« Le plan de maîtrise sanitaire comprend :

3.1. Les documents relatifs aux bonnes pratiques d'hygiène concernant :

3.1.1. Le personnel :

- plan de formation à la sécurité sanitaire des aliments ;
- hygiène personnelle :
- tenue vestimentaire : descriptif, gestion ;
- état de santé du personnel : instructions.

3.1.2. L'organisation de la maintenance des locaux, des équipements et du matériel.

3.1.3. Les mesures d'hygiène préconisées avant, pendant et après la production :

- plan de nettoyage-désinfection ;
- instructions relatives à l'hygiène.

3.1.4. Le plan de lutte contre les nuisibles.

3.1.5. L'approvisionnement en eau, les circuits d'arrivée d'eau potable/ d'eau de mer et d'évacuation des eaux résiduaires.

3.1.6. La maîtrise des températures.

3.1.7. Le contrôle à réception et à expédition.

3.2. Les documents relatifs aux procédures fondées sur les principes de l'HACCP :

3.2.1. Le champ d'application de l'étude.

3.2.2. Les documents relatifs à l'analyse des dangers biologiques, chimiques et physiques et mesures de maîtrise associées (principe n° 1).

3.2.3. Les documents relatifs aux points déterminants lorsqu'il en existe (points critiques pour la maîtrise pour les CCP, ou niveau du seuil de maîtrise pour les PRPo) :

- la liste argumentée des points déterminants (dont CCP, PRPo) précisant le caractère essentiel de la ou des mesures de maîtrise associée (s) (principe n° 2) ;
- pour chaque point déterminant :
- la validation des limites critiques pour les CCP et les objectifs/ niveaux de seuils pour les PRPo (principe n° 3) ;
- les procédures de surveillance (principe n° 4) ;
- la description de la ou des actions correctives (principe n° 5) ;



- les enregistrements de la surveillance des points déterminants et des actions correctives (principe n° 7).

3.2.4. Les documents relatifs à la vérification (principe n° 6).

3.3. Les procédures de traçabilité et de gestion des produits non conformes (retrait, rappel...). «

« Pour établir ces documents, le professionnel peut se référer à un guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP validé pour les domaines d'activités concernés. »

« L'agrément ne peut être accordé qu'aux établissements dont le dossier est complet et jugé recevable et pour lesquels la conformité aux conditions sanitaires des installations, d'équipement et du fonctionnement fixées par la réglementation a été constatée par un vétérinaire officiel au sens du V de l'article [L. 231-2](#) du code rural et de la pêche maritime pour les abattoirs et les ateliers de découpe, ou, pour les autres établissements, par un agent habilité conformément au I de l'article L. 231-2 du code rural et de la pêche maritime au cours d'une visite de l'établissement.

S'il apparaît à l'issue de l'instruction de la demande d'agrément prévue à l'article 3 qu'un établissement, dont le dossier est complet et jugé recevable, respecte les exigences en matière d'installations et d'équipement, un agrément conditionnel est accordé pour une période de trois mois.

Cette période est mise à profit par l'exploitant pour fournir les éléments de vérification du bon fonctionnement du plan de maîtrise sanitaire dans l'entreprise. Avant la fin de cette période, si un contrôle officiel établit que les conditions sanitaires mentionnées au premier alinéa sont respectées, l'agrément est accordé. Dans le cas contraire, l'agrément conditionnel peut être renouvelé pour une nouvelle période de trois mois. La durée totale de l'agrément conditionnel ne peut excéder six mois. »

**ANNEXE 4 – SUIVI DES ACTUALISATIONS DE L'AVIS**

Les modifications apportées portent sur les formules de calcul de la prévalence de boîtes contaminées ( $\pi$ ) et de la probabilité moyenne de tomber malade en consommant une boîte ( $P(\text{malade}, K=1)$ ) (suppression du paramètre sensibilité de la méthode d'analyse  $Se$ ) (page 32). Il s'agit d'erreurs typographiques, le modèle utilisé tient compte des formules correctes.

Date	Page	Description de la modification
19 septembre 2019		Première version signée de la note de l'Anses
24 janvier 2020	32 section 3.4.4.2	<p><u>Version initiale du 19 septembre 2019</u></p> <p>«</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Si les bactéries sont réparties de façon hétérogène (c'est-à-dire que la contamination est décrite par une loi négative binomiale) :</li> </ul> $\pi = P(X > 0) = 1 - P(X = 0) = 1 - \left(\frac{s}{s + Se \cdot \mu \cdot m_b}\right)^s$ <ul style="list-style-type: none"> <li>Si les bactéries sont réparties de façon homogène (c'est-à-dire que la contamination est décrite par une loi de Poisson, pouvant être vu comme un cas particulier de la loi binomiale négative) :</li> </ul> $\pi = P(X > 0) = 1 - P(X = 0) = 1 - e^{(-Se \cdot \mu \cdot m_b)}$ <p>(...)</p> <p>En considérant une relation dose/réponse exponentielle de paramètre « r » égal à <math>2,14 \cdot 10^{-3}</math> pour <i>Salmonella</i> (FAO/WHO 2002), il est possible de calculer la probabilité moyenne de tomber malade en consommant un nombre de boîtes K, chaque boîte ayant une masse « <math>m_b</math> », en appliquant la formule suivante pour <math>K = 1</math> :</p> $P(\text{malade}, K = 1) = 1 - \left(1 + \frac{r \cdot Se \cdot \mu \cdot m_b}{s}\right)^{-s}$ <p><u>Version révisée du 24 janvier 2020</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Si les bactéries sont réparties de façon hétérogène (c'est-à-dire que la contamination est décrite par une loi négative binomiale) :</li> </ul> $\pi = P(X > 0) = 1 - P(X = 0) = 1 - \left(\frac{s}{s + \mu \cdot m_b}\right)^s$ <ul style="list-style-type: none"> <li>Si les bactéries sont réparties de façon homogène (c'est-à-dire que la contamination est décrite par une loi de Poisson, pouvant être vu comme un cas particulier de la loi binomiale négative) :</li> </ul> $\pi = P(X > 0) = 1 - P(X = 0) = 1 - e^{(-\mu \cdot m_b)}$ <p>(...)</p> <p>En considérant une relation dose/réponse exponentielle de paramètre « r » égal à <math>2,14 \cdot 10^{-3}</math> pour <i>Salmonella</i> (FAO/WHO 2002), il est possible de calculer la probabilité moyenne de tomber malade en consommant un nombre de boîtes K, chaque boîte ayant une masse « <math>m_b</math> », en appliquant la formule suivante pour <math>K = 1</math> :</p> $P(\text{malade}, K = 1) = 1 - \left(1 + \frac{r \cdot \mu \cdot m_b}{s}\right)^{-s}$