

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 14 juin 2017

## **AVIS** **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

**relatif à une demande d'avis sur un protocole visant à évaluer l'efficacité  
des additifs en vue de la décontamination des matières premières  
pour l'alimentation animale, contaminées par *Salmonella* spp.  
(Protocole KHIRAL)**

---

*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 18 Juillet 2016, par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF), pour la réalisation d'une expertise scientifique sur un protocole visant à évaluer l'efficacité des additifs en vue de la décontamination des matières premières pour l'alimentation animale, contaminées par *Salmonella* spp. (protocole KHIRAL).

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

Le protocole KHIRAL a été élaboré par l'institut TECALIMAN, dans le cadre de la constitution du dossier de demande d'autorisation, au titre du Règlement CE 1831/2003, d'additifs entrant dans le nouveau groupe fonctionnel « améliorateurs de conditions d'hygiène ». Préalablement à l'instruction de ces dossiers puis à leur inscription dans cette catégorie, les professionnels français de l'alimentation animale ont travaillé au dépôt de demandes d'autorisation d'essais telles que prévues à l'article 3 point 2 de ce règlement. Afin de valider l'efficacité *a priori* des produits qui feront l'objet de ces demandes d'essais, TECALIMAN a bâti un protocole visant à évaluer l'efficacité bactéricide de tout produit réputé avoir un effet sur une flore ciblée dans une

matrice d'aliments pour animaux. Ce protocole doit permettre de vérifier, de manière standardisée et en unité pilote, l'efficacité de molécules candidates, aux doses proposées, sur une flore bactérienne composée d'entérobactéries, présente dans une matière première (un tourteau de soja) et dans deux aliments composés (un aliment pour poules pondeuses et un aliment pour porcs charcutiers).

Afin d'obtenir cette autorisation, par la Commission Européenne, d'utilisation de ces produits « améliorateurs des conditions d'hygiène », le pétitionnaire doit soumettre un dossier technique, à l'EFSA. Les résultats de cette étude viendront nourrir les dossiers, en vue de leur autorisation de mise sur le marché définitive dans la catégorie susvisée.

L'avis de l'Anses est demandé sur la validité scientifique et technique de ce protocole. Plus précisément, la saisine pose les questions suivantes :

- Les données obtenues par le biais de ce protocole sont-elles recevables dans le cadre d'une évaluation de l'efficacité d'un additif ?
- Ce protocole répond-il aux exigences et normes scientifiques actuelles ?

## **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'Anses a confié l'instruction de cette saisine à deux experts du groupe de travail SALAN «Salmonelles en alimentation animale » et à deux rapporteurs externes.

M. Fabrice Putier, directeur de Tecaliman, a été auditionné le 23 février 2017 par les rapporteurs. Les travaux ont été présentés et adoptés au GT SALAN lors de sa séance du 30 mars 2017.

Le comité d'experts spécialisé ALAN « Alimentation animale» a adopté les travaux d'expertise collective ainsi que ses conclusions et recommandations lors de sa séance du 23 Mai 2017, et a fait part de cette adoption à la direction générale de l'Anses.

Le protocole, soumis à l'évaluation de l'Anses, figure en annexe 1.

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.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

### **Périmètre et limite du champ d'expertise**

Les experts ont évalué la validité scientifique et technique du protocole en se basant sur les éléments fournis par le pétitionnaire, au regard de l'objectif qui y est fixé : efficacité au moins égale à 3 réductions décimales (3 log) de la concentration en entérobactéries dénombrées à

37°C. Au travers de cette évaluation de protocole, les experts ne se prononcent pas sur la question plus générale de la pertinence des 3 réductions décimales, tel que retenues comme objectif de performance pour les aliments composés destinés aux troupeaux de plus de 250 volailles reproductrices des espèces *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo*, ayant subi un traitement thermique validé. Cette question sera traitée dans la saisine 2016-SA-0029 «Danger *Salmonella* en alimentation animale ».

### **3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES ALAN**

Les principales modifications qui ont été demandées par les experts dans le protocole KHIRAL sont les suivantes :

#### Titre du protocole

L'intitulé initial du protocole porte sur une évaluation de l'efficacité bactériolytique d'additifs devant entrer dans la nouvelle catégorie « améliorateurs des conditions d'hygiène », « *réduisant une contamination microbiologique spécifique* » (Règlement (UE) 2015/2294<sup>1</sup>). Le terme « bactériolytique » devrait être remplacé par « bactéricide ». Par ailleurs, il était prévu, au départ, que les essais porteraient sur une « flore ciblée » incluant les entérobactéries et un microorganisme modèle (*Salmonella* spp.). Or, l'utilisation d'un microorganisme modèle, non pathogène, dans les essais proposés, n'est pas considérée comme pertinente par les experts, étant donné qu'il n'existe pas de telles souches qui possèderaient les mêmes propriétés de résistance que tous les sérotypes de *Salmonella*. Il est donc recommandé que les essais portent uniquement sur les entérobactéries, afin de ne pas induire de confusion quant à la signification de micro-organisme modèle.

#### Objectif

Il serait souhaitable que ce paragraphe soit reformulé de manière à préciser que :

- L'objectif de ce protocole serait d'évaluer la performance bactéricide d'un produit actif sur les entérobactéries, dans une matière première et deux aliments ;
- Ce protocole, tel que mis en place (nombre d'échantillons testés, charges microbiennes initiale et après traitement), permettrait de démontrer une efficacité au moins égale à 3 réductions décimales de la concentration en entérobactéries, dénombrées à 37°C.

Initialement, les matrices prévues étaient un tourteau de soja, un aliment pour porcs charcutiers et un aliment « croissance » pour poulets de chair. Selon les informations communiquées lors de l'audition, ce dernier a été remplacé par un aliment pour poules pondeuses en raison d'une structure plus grossière de l'aliment et de la présence de carbonate de calcium qui tamponnerait l'effet des acidifiants (scénario défavorable).

<sup>1</sup> Règlement (UE) 2015/2294 de la Commission du 9 décembre 2015 modifiant le règlement (CE) 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil afin d'établir un nouveau groupe fonctionnel d'additifs pour l'alimentation animale [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=uriserv:OJ.L\\_.2015.324.01.0003.01.FRA&toc=OJ:L:2015:324:TOC](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2015.324.01.0003.01.FRA&toc=OJ:L:2015:324:TOC), consulté le 08/06/2017

### Principe

Etant donné que seules les entérobactéries seront testées dans ce protocole, la phrase portant sur un germe modèle non pathogène devrait être supprimée. Par ailleurs, la durée de contact du produit actif avec la matrice devrait être modifiée (24h à 72 h selon les matrices) (Cf. § conditions de stockage).

### Matériel

#### Les matières premières

Le rôle des déchets d'épouseuse de meunerie devrait être explicité dans le protocole, l'objectif étant d'assurer une présence initiale d'entérobactéries endogènes pour l'inoculation des matrices testées.

#### Matériel de prélèvement et de conditionnement

Au cours de l'audition, il a été précisé que les prélèvements porteraient sur 25 g au lieu de 100 g, pour des raisons de disponibilité des étuves dans le laboratoire d'analyses.

### Méthode

#### Préparation des essais

Il serait souhaitable de préciser dans ce paragraphe que le dénombrement des entérobactéries se fera en deux temps (déchets de meunerie puis matrices testées) et qu'en fonction des résultats de dénombrement obtenus dans les déchets, le taux d'incorporation de ces derniers dans les matrices, sera ajusté afin d'assurer une contamination initiale d'environ  $10^5$  UFC /g en entérobactéries.

#### Plan d'essais

Le protocole précise que les dénombrements des entérobactéries seront effectués sur 8 échantillons. Les experts soulignent cependant que 4 échantillons suffiraient largement pour assurer une puissance statistique permettant de démontrer une réduction décimale de 3 log.

Par ailleurs, les experts soulignent le caractère indispensable :

- d'un dénombrement à  $T_0$  sur les matrices, après inoculation et avant traitement ;
- du suivi d'un témoin négatif (avec inoculation mais sans traitement), pour toutes les matrices testées, afin de suivre l'évolution naturelle de la flore des trois matrices en parallèle des essais réalisés et d'être en mesure d'attribuer, *in fine*, la réduction microbienne au produit testé.

Les modifications à apporter au tableau sont les suivantes :

- L'unité « Kg » devrait être ajoutée au chiffre 50 afin de préciser la quantité de déchets de meunerie. Les termes « quantité de supports de germes » devraient être supprimés ;
- Dans la dernière colonne dont l'intitulé devrait être remplacé par « modalités de stockage », et afin de se rapprocher des conditions de stockage terrain, les essais devraient être réalisés comme suit :

- Avec traitement au produit actif:
  - ✓ Pour le tourteau de soja, les temps de contact avec le produit actif seraient de 24h, 48h et 72h, aux températures de stockage de 4°C et 30°C : 4 échantillons seraient prélevés et analysés à  $T_0$  (avant traitement) et aux trois durées de stockage ( $T_{24}$ ,  $T_{48}$  et  $T_{72}$ ), pour chaque température ;
  - ✓ Pour les aliments destinés aux porcs charcutiers et aux poules pondeuses, le temps de contact avec le produit actif serait de 24h à une température de stockage de 20°C : 4 échantillons seraient prélevés et analysés à  $T_0$  (avant traitement) et  $T_{24}$ .
- Sans traitement par le produit actif : lots « témoins »:

Pour le tourteau de soja, l'aliment porcs charcutiers et l'aliment poules pondeuses, les mêmes modalités de stockage (températures et durées) devraient être appliquées à ces lots « témoins » que celles des lots ayant subi un traitement. En revanche, seuls des prélèvements à  $T_0$  et à l'issue de la durée maximale de stockage seraient nécessaires (pour le tourteau de soja, 4 échantillons prélevés et dénombrés uniquement à  $T_0$  et  $T_{72}$  pour les températures de 4°C et 30°C ; pour les aliments composés, 4 échantillons prélevés et dénombrés à  $T_0$  et  $T_{24}$  pour la température de 20°C).

Le protocole ainsi proposé par les experts a été schématisé en annexe 2.

Enfin, le protocole précise que les essais seront répétés trois fois. Les experts soulignent que, pour augmenter la représentativité des essais, ces 3 répétitions devraient concerner des lots différents pour chaque matrice. En revanche, les essais «témoins» pour les trois matrices pourraient être réalisés une seule fois.

### Conditions de stockage

Ce nouveau paragraphe devrait être ajouté dans le protocole, afin d'expliquer les raisons qui ont amené le pétitionnaire à choisir les conditions de stockage telles qu'évoquées dans le paragraphe 4.2. Pour le tourteau de soja, la durée de mise en contact, jusqu'à 72 heures, est justifiée par la possibilité d'un délai de stockage supplémentaire avant son expédition dans les usines de fabrication des aliments. Etant donné que certains de ces produits peuvent présenter une efficacité bactéricide après un temps de contact plus long, les experts soulignent que les professionnels pourraient avoir intérêt à prolonger cette durée jusqu'à plusieurs jours, en fonction de la nature et de la concentration des produits testés. Quant aux températures de stockage de 4°C et 30°C, elles représenteraient la fourchette des conditions saisonnières qui peuvent être rencontrées sur le terrain. Pour les aliments destinés aux poules pondeuses et aux porcs charcutiers, la durée de mise en contact de 24 heures est justifiée par la nécessité d'un effet avant la consommation de ceux-ci par les animaux, dans un délai rapide (faible capacité de stockage des produits finis). La température de stockage de 20°C représenterait la température moyenne des silos de stockage.

### Réalisation des essais

Les experts préconisent que cette partie soit présentée sous la forme d'un schéma afin de faciliter la compréhension du texte.

### Transport des échantillons pour analyse

Il est important de s'assurer de la maîtrise des conditions de transport des échantillons aux mêmes températures que celles du stockage, lors de leur acheminement vers le laboratoire d'analyse ; la durée du transport ne doit pas excéder les 24 heures. Le protocole devrait souligner ce point.

### Analyse

Etant donné que ce protocole KHIRAL s'inscrit dans un contexte européen d'autorisation d'additifs pour l'alimentation animale, il paraît plus judicieux de remplacer la norme NF V08-054 par la norme ISO 21528-2. Par ailleurs, le terme « méthode assimilée » pour faire référence à une méthode alternative ne paraît pas approprié et devrait être remplacé par « méthode reconnue équivalente ».

L'objectif de l'ajout d'eau peptonnée tamponnée est, selon le protocole, de « neutraliser » l'action bactéricide résiduelle du produit sur la matrice. Au cours des auditions, il a été précisé que le terme « neutraliser » est à comprendre dans le sens de « faire cesser » l'action : il ne s'agit donc pas de « neutraliser » le pH de la suspension mère au sens de ramener le pH à 7. Cette précision devrait être apportée au protocole.

### Traitement des résultats

Il convient de reformuler la première phrase de ce paragraphe de manière à préciser que les résultats microbiologiques « *sont conditionnés à leurs modalités d'obtention : additif testé, températures, durées de traitement, dose, matrices.* »

### **Conclusion du GT SALAN**

Le protocole KHIRAL, moyennant les modifications recommandées par les experts présente les caractéristiques scientifiques et techniques permettant d'évaluer si des additifs ont une efficacité bactéricide au moins égale à trois réductions décimales de la concentration en entérobactéries dénombrées à 37°C. Par ailleurs, étant donné que ce protocole s'inscrit dans un contexte européen d'autorisation d'additifs pour l'alimentation animale, et dans le cas où l'objectif de performance à atteindre serait différent des 3 réductions décimales, une adaptation des essais (nombre d'échantillons à prélever, concentration initiale en entérobactéries, nombre de répétitions ...) devrait être envisagée.

#### **4. 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 Alimentation animale. L'Anses souligne que l'avis de l'Agence sur ce protocole à des fins d'essais de produits, préalablement à leur candidature en tant qu'additifs, n'engage en rien l'Efsa, en charge de l'évaluation des dossiers de demande d'autorisation d'additifs en alimentation animale.

Dr Roger Genet

#### **MOTS-CLES**

Tourteau de soja, aliment porcs charcutiers, aliment poules pondeuses, entérobactéries, acides organiques, bactéricide, 3 réductions décimales, 3 log, protocole.

#### **KEYWORDS**

Soybean meal, growing-finishing pigs feedstuffs, laying hens feedstuffs, enterobacteriaceae, organic acids, bactericidal, 3 decimal reductions, 3 log, experimental protocol.

ANNEXE 1

## Protocole d'évaluation de l'efficacité bactériolytique de tout produit réputé avoir un effet sur une flore ciblée dans une matrice de nutrition animale

### Essais KHIRAL

#### 1. Objectif

L'objectif de ce type d'évaluation est de déterminer l'efficacité d'un acide simple, d'un mélange d'acide ou d'un autre produit sur une flore ciblée d'une matière première destinée à l'alimentation animale (Tourteau de soja) et dans deux aliments (Aliment poulet et Aliment porc). Le traitement sera considéré comme efficace si une réduction ciblée des flores est obtenue dans un temps donné.

#### 2. Principe

Le principe de cette évaluation consiste à introduire dans une matière première (Tourteau de soja) et dans deux aliments (Aliment poulet et Aliment porc) dont les niveaux des flores initiales ciblées est connu, au besoin à l'aide de contaminations maîtrisées, un produit actif à une dose définie par le fournisseur. L'effet du produit est testé par un dénombrement des flores avant introduction du produit et après cette introduction et une durée de contact déterminée (24 à 48 h selon les matrices).

Ces essais seront effectués sur chacun des produits candidats aux doses d'usage recommandées par leur fabricant respectifs dans la matière première et dans les aliments. Les produits seront réputés efficace si une décroissance ciblée est obtenue avec les entérobactéries.

Une flore de germe modèle non pathogène sera également testée pour éventuellement ouvrir la perspective de son usage lors de la validation de l'efficacité des produits en situation industrielle.

#### 3. Matériel

##### 3.1. Les matières premières

###### 3.1.1. Déchets de meunerie

Des déchets d'épaveuse de meunerie seront employés pour assurer la présence d'une flore ciblée en entérobactéries. Ils ont traditionnellement une contamination voisine de  $10^7$  et une incorporation à un niveau de 1 % permet d'assurer une contamination initiale voisine de  $10^5$ .

###### 3.1.2. Germe modèle non pathogène

Un micro-organisme modèle est un micro-organisme non-pathogène utilisé pour évaluer l'efficacité d'un procédé de décontamination. Ce dernier sert à démontrer que le procédé utilisé a la capacité de détruire un micro-organisme pathogène cible. Ainsi, son comportement et sa résistance à un stress (chimique, thermique ...) est similaire à celui du pathogène cible (e.g. Salmonella) sans en présenter les caractéristiques de pathogénicité.

Une société extérieure fournira à Tecaliman un micro-organisme modèle non-pathogène caractérisé pour Salmonella sous forme de poudre. Ce micro-organisme modèle permettra de tester le pouvoir de décontamination de différents produits actifs en conditions réelles. Le niveau d'inoculation cible de chacun des aliments / matières premières serait au minimum  $10^8$  UFC/g (en cours de discussion).

###### 3.1.3. Matières premières

Un tourteau de soja sera ciblé afin de faciliter l'échantillonnage ultérieur, un léger broyage sur un broyeur à cylindre sera appliqué.

###### 3.1.4. Aliments

Deux Aliments seront employés : Aliment porc charcutier et aliment Poulet croissance. Leur formule sera standardisée et communiquée dans les rapports.

###### 3.1.5. Acide ou produit actif

Chacun des produits sera fourni par le fabricant et incorporé à la dose recommandée selon les matrices. Ils seront accompagnés de leurs FDS et de leurs conditions d'usage.

##### 3.2. Matériel

###### 3.2.1. Broyeur à cylindre

Il s'agit d'un broyeur Socam à un rang de cylindre dont l'écartement peut être réglé.

###### 3.2.2. Mélangeur

Un mélangeur à pâles, de marque Théaudin, d'une contenance de 100 l, est utilisé.

### 3.2.3. Matériel de pulvérisation

Pour les produits liquides, un système de pulvérisation permettant un bilan massique de l'incorporation est utilisé. Il s'agit d'une cuve de 2 l en acier inox et d'un réseau d'air comprimé permettant de mettre le système sous pression (0 à 5 bars). Douze formats de buse d'injections à angles plats peuvent être utilisés avec ce système. Dans la mesure du possible, une même buse sera employée pour l'ensemble des produits après validation de sa zone de pulvérisation.

### 3.2.4. Matériel de prélèvement et de conditionnement

Le mélangeur et le bac de réception sont nettoyés par brossage et par aspiration. Suite aux mélanges, les matières premières traitées sont introduites dans des sacs plastifiés non stériles de 20 l, puis sont divisées à l'aide de deux diviseurs de taille différente.

Les lots de produits avant mélange sont divisés ou constitués de fractions aliquotes pour obtenir des lots réputés similaires. Les mélanges seront divisés jusqu'à obtenir des échantillons d'environ 100 g (+/-10g). Ces échantillons seront ensuite placés dans des pots plastiques stériles.

## 4. Méthode

### 4.1. Préparation des essais

Les contaminations des matrices (Tourteau de soja et aliments) et des déchets de meunerie en entérobactéries seront dénombrées. Le taux d'incorporation des déchets de meunerie sera déterminé selon les résultats de ces dénombrements afin d'assurer une contamination initiale d'environ  $10^5$  entérobactéries / g.

L'humidité initiale des matrices sera mesurée.

Le tourteau de soja sera concassé sur le broyeur à cylindre.

Des fractions des matrices et des supports de contaminations (Déchets de meunerie et support du Germe modèle non pathogène) seront préparées à l'aide de division ou de fractionnement afin de constituer des lots initiaux réputés identiques.

### 4.2. Plan d'essais

Les essais seront effectués sur 3 matrices et répétés trois fois :

Matrice	Répétition	Quantité en mélange	Quantité de produit traité	Analyses / population de germe
Tourteau de soja	1	50 + qté de supports de germes	X %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement 8 à 48 h après traitement
	2	50 + qté de supports de germes	X %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement 8 à 48 h après traitement
	3	50 + qté de supports de germes	X %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement 8 à 48 h après traitement
Aliment Poulet croissance	1	50 + qté de supports de germes	Y %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement
	2	50 + qté de supports de germes	Y %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement
	3	50 + qté de supports de germes	Y %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement
Aliment Porc charcutier	1	50 + qté de supports de germes	Y %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement
	2	50 + qté de supports de germes	Y %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement
	3	50 + qté de supports de germes	Y %	8 avant traitement 8 à 24 h après traitement

### 4.3. Réalisation des essais

Les traitements seront appliqués sur des lots de 50 kg.

La moitié du lot de matrice ciblé sera introduite dans le mélangeur (25 kg). Les déchets de meunerie et le

support du germe modèle non pathogène (Inocula) seront ensuite répartis sur toute la longueur. Le reste de la matrice est introduit au-dessus. Après mélange de 5 minutes à 60 tr/mn, 8 fractions aliquotes sont prélevées par quartage dans le mélangeur avant incorporation du produit à tester afin de déterminer la flore initiale. La quantité totale de ces fractions correspond à la quantité des inocula ce qui conduit à obtenir une masse finale dans le mélangeur de 50 kg sur laquelle le traitement sera appliqué.

Les produits en poudre sont pesés avec une balance +/- 1 g et l'aliment avec une balance +/- 2 g. L'acide est ajouté et un mélange est à nouveau réalisé pendant 5 minutes à 60 tr/mn.

Pour les produits liquides, l'incorporation est assurée par pulvérisation après le mélange avec les déchets de meunerie. Afin de procéder à la pulvérisation, une première phase de préparation est mise en place. Celle-ci consiste à peser le système de pulvérisation à vide avec une balance +/- 1 g, puis à le remplir avec la quantité de produit liquide nécessaire (+/- 5g). Le système de pulvérisation est ensuite placé sur le couvercle du mélangeur et est raccordé à l'air comprimé. Le manomètre réglant la pression appliquée sur l'acide est réglé à 1.5 bars. Le mélange est commencé et la pulvérisation commence 10 secondes après. La durée totale d'homogénéisation est de 5 minutes.

Le système de pulvérisation est ensuite déconnecté de l'air comprimé et retiré du couvercle du mélangeur. Le système est à nouveau pesé sur une balance +/- 1g, la masse est relevée, évent ouvert.

Le mélangeur est ensuite vidangé dans le bac de réception et 8 échantillons sont prélevés par quartage après incorporation du produit à tester afin de déterminer les flores finales.

Puis, sans délai, le produit restant est introduit à l'aide d'une pelle propre dans des sacs de 20 l plastifiés et identifiés par le code du mélange.

Le mélangeur est enfin nettoyé par grattage avec une brosse et une spatule.

#### 4.4. Transport des échantillons

Le transport des échantillons vers le laboratoire d'analyse a lieu à la ou aux température (s) demandée (s) pour le test dans les 24 h suivant la fabrication du mélange.

#### 4.5. Analyse

Chaque échantillon donne lieu à une analyse de la flore ciblée : 8 avant incorporation et 8 après incorporation et un délai de 24h nécessaire pour l'envoi des échantillons au laboratoire. (+ 8 échantillons à 48 h avec le tourteau de soja).

Les analyses sont donc effectuées **24 h après l'incorporation** (et 48 h pour le tourteau de soja). Au total, chaque essai compte au minimum 168 analyses qui sont effectuées sur des échantillons **de 100g**.

Pour les entérobactéries, les dénombrements sont effectués selon la Norme NF V08-054 (37°C) ou assimilés avec une limite de quantification de 10 UFC/g pour les échantillons initiaux et avec une limite de 1 UFC/g après action du produit. Le laboratoire utilise de l'eau peptonée tamponnée et vérifie la neutralité du pH de la suspension mère. Le cas échéant, des pré-essais peuvent être réalisés, afin de définir les conditions de neutralisation du produit employé.

#### 4.6. Traitement des résultats

Deux types de résultats caractérisent les essais :

- Les conditions de réalisation (quantité de produit incorporé, temps d'action, température de stockage...)
- Les résultats microbiologiques

Les résultats des numérations d'entérobactéries seront interprétés sur la base :

- de la contamination moyenne initiale exprimée en log
- de la contamination moyenne finale exprimée en log
- de la variation de contamination exprimée en log

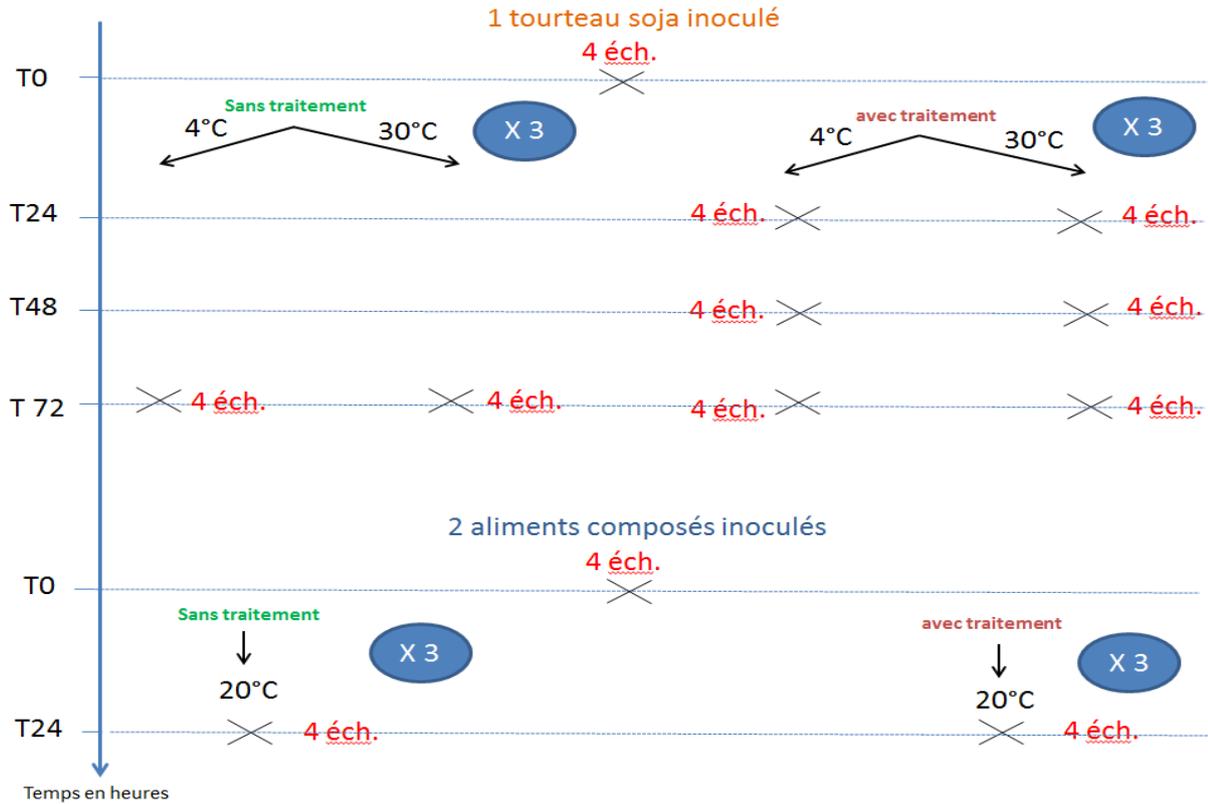
Un test de comparaisons de moyennes non paramétriques (Mann-Whitney) sont effectués.

Les résultats seront valides pour les entérobactéries si une décontamination moyenne de 3 log est constatée avec les 3 répétitions et que les contaminations finales moyenne sont à chaque fois inférieures à (100 entérobactéries/g)  $10^2$ . Seul ce critère sera employé comme démonstration par les autorités.

Pour le germe modèle non pathogène qui serait inoculé à  $10^8$ , une décontamination moyenne de 5 log est attendue lors des 3 répétitions. Même si cette cible est espérée, s'agissant d'essais exploratoires de l'usage de cette flore, le non-respect de cette cible ne pourra pas être tenu comme une démonstration de la non efficacité des produits testés.

ANNEXE 2

Schématisation des essais sur un tourteau de soja et deux aliments composés (poules pondeuses et porcs charcutiers) avec prise d'échantillon



~~X 4 éch.~~ : 4 échantillons à prélever et analyser aux temps indiqués

X 3 : Nombre de répétitions des essais