

Epidémie de salmonellose à *Salmonella enterica* sérotypé Agona chez des nourrissons liée à la consommation de poudres de lait infantile, France, janvier-mai 2005

Rapport rédigé par :

C. Brouard^{1,2}, E. Espié¹, V. Vaillant¹, H. de Valk¹

¹Département des maladies infectieuses, Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France

²Programme de formation à l'épidémiologie de terrain, Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France

Institutions et personnes ayant contribué aux investigations :

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

D. Hulaud, B. Pouyet, F. Thierry

Laboratoire DGCCRF de Rennes

J. Michard

Directions départementales de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes de Mayenne, du Rhône et du Nord

Laboratoire DGCCRF de Lille

Direction départementale des affaires sanitaires et sociales de Seine-Maritime

A.-M. Forgue

Agence française de sécurité sanitaire des aliments

A. Brisabois, A. Kérouanton

Centre national de référence des *Salmonella*

F. Grimont, F.-X. Weill

Direction générale de la santé

M.-C. Paty, L. Pochat, S. Veyrat

Institut de veille sanitaire

C. Brouard, H. de Valk, E. Espié, V. Vaillant

1. Alerte

Fin février 2005, le Centre national de référence (CNR) des *Salmonella* notait une augmentation du nombre de souches de *Salmonella enterica* sérotype Agona isolées chez des nourrissons en janvier-février 2005 : 16 souches avaient été isolées contre une en moyenne sur cette période en 2003 et 2004. Par ailleurs, en février, la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (Ddass) de Seine-Maritime (76) avait été chargée d'investiguer 6 cas groupés d'infections à *S. Agona*.

Le 3 mars 2005, l'enquête menée par la Ddass 76 montrait que 4 de ces 6 cas étaient des nourrissons qui avaient tous consommé des poudres de lait infantile de même marque au cours des 7 jours ayant précédé l'apparition de leurs signes cliniques.

Le même jour, l'Institut de veille sanitaire (InVS) mettait en œuvre une investigation épidémiologique afin de confirmer l'existence d'une épidémie, d'en mesurer l'importance, de générer des hypothèses sur son origine et de proposer des mesures de contrôle et de prévention adaptées.

2. Méthodes

2.1 Enquêtes épidémiologiques

Définition de cas

Un cas a été défini comme un nourrisson (enfant de moins d'1 an), résidant en France, ayant eu, depuis le 1^{er} janvier 2005, un isolement de *Salmonella* Agona dans un prélèvement de selles, de sang ou d'urines à l'occasion de la survenue de symptômes compatibles avec une infection à *Salmonella*.

Identification des cas

Les cas identifiés par le CNR des *Salmonella* étaient notifiés à l'InVS. En cas de signalement direct d'un cas suspect par des médecins ou des familles, l'InVS demandait la réalisation d'une coproculture et l'envoi de la souche au CNR pour sérotypage.

Enquête descriptive

A partir du 3 mars 2005, les parents des cas ont été interrogés par téléphone à l'aide d'un questionnaire standardisé.

Il recueillait les informations suivantes (annexe 1) :

- les signes cliniques survenus au cours de l'épisode de salmonellose,
- l'existence de maladie chronique, de prise de traitement au long cours, d'antibiothérapie, phytothérapie ou homéopathie au cours du mois ayant précédé l'apparition des signes cliniques,
- l'existence de cas de diarrhées dans l'entourage du cas au cours des 7 jours ayant précédé ou suivi l'apparition des signes cliniques,
- la prise de repas en dehors du foyer familial (crèche, nourrice...) dans les 7 jours ayant précédé l'apparition des signes cliniques,
- la consommation alimentaire de l'enfant (produits carnés, charcuterie, produits laitiers, aliments pour bébés, gâteaux/friandises, boissons...) au cours des 7 jours ayant précédé l'apparition des signes cliniques,
- le mode de préparation des biberons (eau utilisée pour la préparation des biberons, méthodes de lavage, de stérilisation et de chauffage des biberons, préparation des biberons à l'avance...),
- l'information sur la marque, le lieu d'achat et le numéro de lot de lait infantile consommé par le nourrisson.

Enquête cas-témoins

Une enquête cas-témoins a été réalisée par téléphone du 3 au 4 mars par les épidémiologistes de l'InVS afin de tester l'origine alimentaire suspectée par les résultats des premiers interrogatoires.

Les cas inclus étaient les cas identifiés par le CNR des *Salmonella* à la date du 3 mars 2005. Les témoins ont été recrutés auprès des laboratoires de bactériologie hospitaliers ou privés ayant réalisé les isollements de *S. Agona* des cas et auprès de leurs médecins traitants. Ils devaient avoir le même âge (à plus ou moins 2 mois près) que les cas et ne pas avoir présenté de gastro-entérite ou d'épisode fébrile au cours du mois précédant l'interrogatoire.

Le questionnaire administré était le même pour les cas et les témoins.

Les parents des témoins ont été interrogés sur les expositions de leur enfant au cours des 7 jours ayant précédé l'interrogatoire.

Analyse statistique

L'analyse des données a été effectuée sur Epi Info version 3.3.2 (CDC Atlanta, OMS Genève). La force de l'association entre l'aliment suspecté et la maladie a été mesurée par l'odds ratio (OR) pondéré de Mantel-Haenszel. La précision de l'OR était donnée par son intervalle de confiance à 95 %.

2.2 Enquête sur les poudres de lait

Des enquêtes ont été menées par la Direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF) et les Directions départementales de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DDCCRF) de la Mayenne (53) et du Nord (59) dans les entreprises productrices des poudres de lait infantile suspectées. Ces enquêtes avaient pour objectifs d'identifier l'ensemble des processus de fabrication et de conditionnement, les types de produits fabriqués et conditionnés sur les chaînes de production et les zones de distribution (nationale et internationale) de ces poudres de lait. Des prélèvements ont été réalisés dans ces entreprises au niveau :

- de l'échantillothèque,
- des matières premières,
- des produits en cours de fabrication,
- des produits finis,
- de l'environnement des chaînes de fabrication et de conditionnement (prélèvements de surface).

En parallèle, des prélèvements de poudres de lait infantile ont été effectués auprès de familles ayant conservé la(les) boîte(s) de lait consommée(s) dans les 7 jours précédant l'apparition des signes cliniques.

Les prélèvements alimentaires et environnementaux ont été envoyés aux laboratoires des DDCCRF 35 et 59 et au Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agro-alimentaires (Lerqap) de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) pour la recherche de salmonelles et typage.

Des analyses ont également été réalisées à l'initiative des entreprises productrices dans leurs laboratoires ou à l'Afssa.

Plusieurs méthodes de détection ont été simultanément appliquées à ces échantillons (deux méthodes bactériologiques et trois méthodes alternatives) (Annexe 4).

2.3 Enquêtes microbiologiques

Souches d'origine humaine

Au CNR des *Salmonella*, un échantillon de souches de *Salmonella* Agona isolées chez les cas (cas "épidémiques") a été comparé par électrophorèse en champ pulsé après macrorestriction de l'ADN par *Xba*I (PFGE) à un échantillon de souches de *S. Agona* isolées en 2004 chez des nourrissons et en 2005 chez des patients de plus de 2 ans (cas "non épidémiques").

Souches d'origine non humaine

Au Lerqap, des souches de *Salmonella* Agona d'origine alimentaire et environnementale ont été analysées par électrophorèse en champ pulsé (Xbal) selon la même technique standardisée et comparées aux souches de *S. Agona* isolées en 2002 et 2003 référencées dans la base de données Afssa des profils moléculaires et isolées des filières alimentation humaine, alimentation animale, santé et production animale et écosystème.

Comparaison des souches d'origine humaine et non humaine

Les profils de PFGE des souches d'origine humaine, alimentaire et environnementale ont été comparés par le Lerqap à l'aide du logiciel Bionumerics®.

3. Résultats

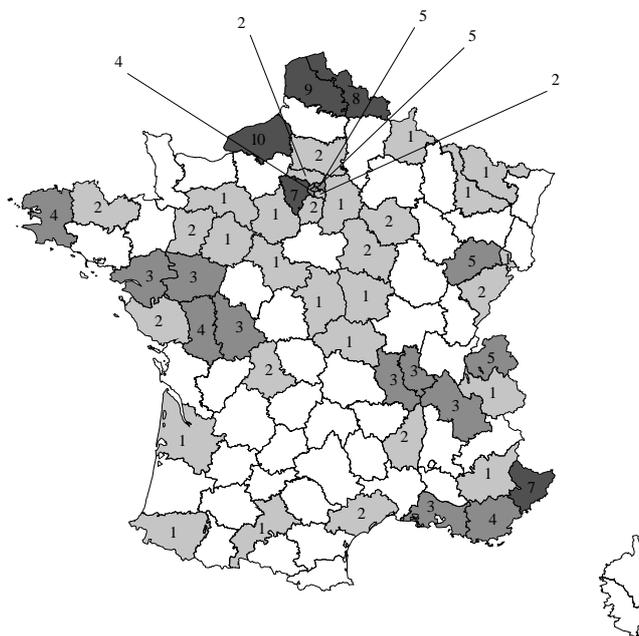
3.1 Description des cas

146 souches de *Salmonella* Agona isolées de nourrissons ont été identifiées par le CNR des *Salmonella* entre le 4 janvier et le 3 juin 2005. Les familles de 141 nourrissons ont pu être interrogées.

Les 141 cas étaient âgés de 1 mois à 12 mois au moment de l'apparition des signes cliniques (médiane : 5,9 mois). Le sex-ratio garçons / filles était de 1 (70/71).

Les 141 cas résidaient sur l'ensemble du territoire français, avec des regroupements de 10 cas en Seine-Maritime et 9 cas dans le Pas-de-Calais (Figure 1).

Figure 1 : Distribution géographique des 141 nourrissons avec une salmonellose à *Salmonella* Agona selon leur département de résidence, France, janvier-mai 2005



Leurs signes cliniques étaient apparus entre le 28 décembre 2004 et le 26 mai 2005 (Figure 2). La diarrhée était quasi-constante (99 %), sanglante pour 56 % des cas. Une fièvre supérieure à 38°C était rapportée par 75 % des familles des nourrissons (Tableau 1).

Cinquante enfants (36 %) ont été hospitalisés, dont 18 le jour même de l'apparition des signes. L'hospitalisation a duré entre 1 et 14 jours (médiane : 4 jours, moyenne : 4,6 jours).

L'évolution a été favorable pour tous. Aucun décès n'a été constaté.

Tableau 1 : Signes cliniques décrits chez les 141 nourrissons au cours de la salmonellose à *Salmonella* Agona. France, janvier-mai 2005

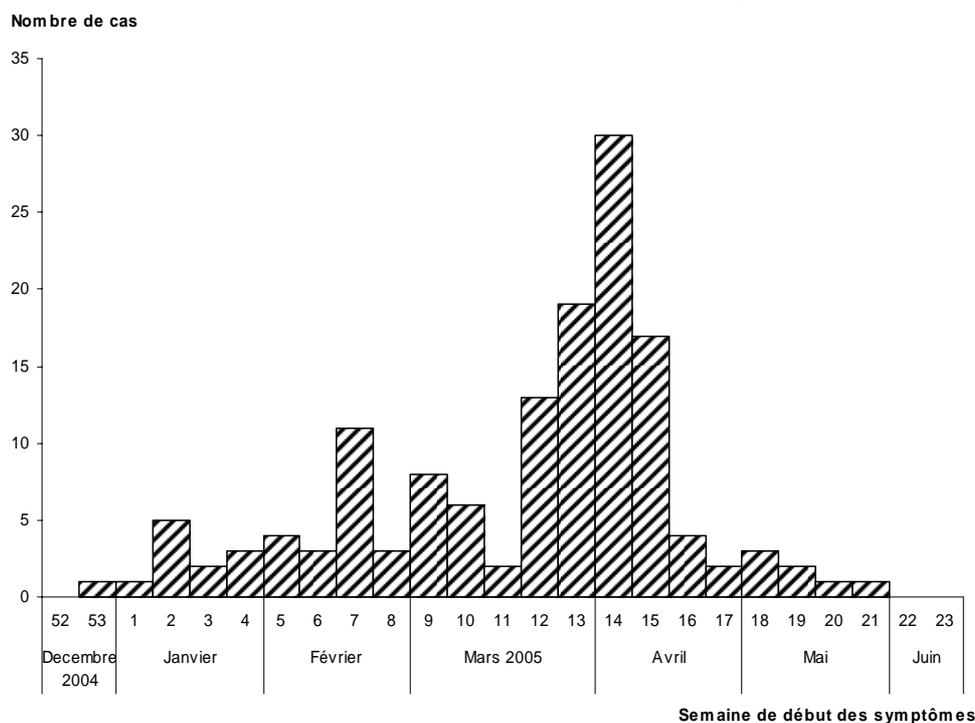
	Nombre de cas	Pourcentage
Diarrhée	140	99
<i>Diarrhée sanglante</i>	79	56
Fièvre	105	75
Douleur abdominale	63*	46
Vomissements	55	39
Nausées	43*	31
Autres signes (fatigue, somnolence...)	17	12

* Nombre de cas renseignés=138

L'épidémie s'est déroulée en deux phases successives :

- une première phase de la semaine 53 de l'année 2004 à la semaine 10 de l'année 2005 présentant un pic épidémique en semaine 7,
- une seconde phase de la semaine 11 à la semaine 21 de l'année 2005, comportant un pic épidémique en semaine 14 plus important que celui observé au cours de la 1^{ère} phase.

Figure 2 : Distribution hebdomadaire des 141 nourrissons avec une salmonellose à *Salmonella* Agona selon la semaine civile de début des symptômes, France, janvier-mai 2005



3.2 Première phase (semaine 53 de l'année 2004- semaine 10 de l'année 2005)

Enquête descriptive

L'enquête menée auprès des familles des 47 cas dont les signes cliniques étaient apparus entre le 28 décembre 2004 et le 13 mars 2005 retrouvait deux aliments consommés par 100 % des nourrissons au cours des 7 jours ayant précédé l'apparition des symptômes (Tableau 2) :

- les poudres de lait infantile : 91 % des nourrissons avaient consommé des poudres de lait infantile de marque Picot, Picot hypo-allergénique pour 49 % et Picot antirégurgitation pour 23 % d'entre eux. Aucune information sur les numéros de lots consommés n'a pu être retrouvée.
- l'eau embouteillée : 9 marques ont été citées, dont la marque E consommée par 66 % des nourrissons.

Tableau 2 : Fréquences de consommation des aliments consommés par au moins 30 % des nourrissons au cours des 7 jours ayant précédé le début des signes cliniques de salmonellose à *Salmonella* Agona, France, janvier-mars 2005

Aliments consommés	Nombre de cas ayant consommé		Proportion de consommateurs (%)
	N=47		
Pots de fruits	17		36
pots fruits marque B*	15		32
pots fruits marque N*	11		23
Pots de légumes	15		32
pots légumes marque B *	15		32
pots légumes marque N *	8		17
Poudres de lait infantile	47		100
poudres de lait Picot	43		91
<i>Picot hypo-allergénique</i>	21		49
<i>Picot antirégurgitation</i>	10		23
<i>Autres poudres de lait Picot</i>	12		28
poudres de lait Blédilait	2		4
autres poudres de lait	2		4
Eau embouteillée (utilisée pour les biberons)	47		100
eau marque E	31		66

* Certains nourrissons avaient consommé à la fois des petits pots de marque B et de marque N.

Dix-sept familles (36 %) ont rapporté l'existence d'au moins un cas de diarrhée dans leur foyer ou dans leur entourage dans les 7 jours ayant précédé ou suivi l'apparition des signes cliniques de leur enfant.

Enquête cas-témoins

L'enquête cas-témoins, réalisée le 3 et 4 mars 2005 auprès des 23 premiers cas interrogés et de 23 témoins, montrait que tous les cas avaient consommé des poudres de lait infantile de marque Picot et qu'aucun des témoins n'en avaient consommé (OR incalculable). Aucune association n'était mise en évidence entre la consommation d'autres aliments et la survenue de la salmonellose.

Aucune différence significative n'était retrouvée concernant les modes de préparation des biberons chez les familles des cas et chez celles des témoins (Tableau 3).

Tableau 3 : Fréquences des expositions et mesures d'association pour les aliments consommés par au moins 25 % des cas. *Salmonella* Agona, France, janvier-mars 2005

Aliments	Cas		Témoins		OR	IC 95 %
	N=23		N=23			
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)		
Exposition alimentaire						
Pots de légumes	6	26	5	22	1,3	0,3-5,0
Pots de légumes marque B	6	26	2	9	3,7	0,7-20,8
Pots de légumes marque N	3	13	2	9	1,6	0,2-10,4
Pots de fruits	6	26	5	22	1,3	0,3-5,0
Pots de fruits marque B	5	22	3	13	1,9	0,4-8,9
Pots de fruits marque N	3	13	3	13	1,0	0,2-5,6
Poudres de lait infantile Picot	23	100	0	0	OR incalculable	
Eau embouteillée marque E	15	65	12	52	1,7	0,5-5,6
Préparation des biberons						
Stérilisation des biberons	14/21	67	14/15	93	0,1	0,02-1,3
Préparation des biberons à l'avance	6/20	30	5/16	31	0,9	0,2-3,9
Conservation des biberons au réfrigérateur si préparation à l'avance	4/6	67	4/5	80	0,5	0,007-14,5

Enquête sur les poudres de lait Picot

L'enquête menée par la DGCCRF rapportait que les poudres de lait infantile de marque Picot étaient fabriquées par l'entreprise Célia située en Mayenne (53). Les inspections de la chaîne de fabrication de l'entreprise Célia menées par la DDCCRF de Mayenne les 8 et 15 mars 2005 n'ont pas mis en évidence de dysfonctionnement. Par ailleurs, tous les autocontrôles réalisés en routine par l'entreprise étaient négatifs pour *Salmonella*.

Les analyses réalisées par la DGCCRF et l'entreprise Célia sur 206 prélèvements alimentaires (matières premières, produits en cours de fabrication, produits finis) et 420 prélèvements environnementaux au niveau des chaînes de fabrication et de conditionnement (Tableau 4, Annexe 2) mettaient en évidence la présence de *Salmonella* Agona dans :

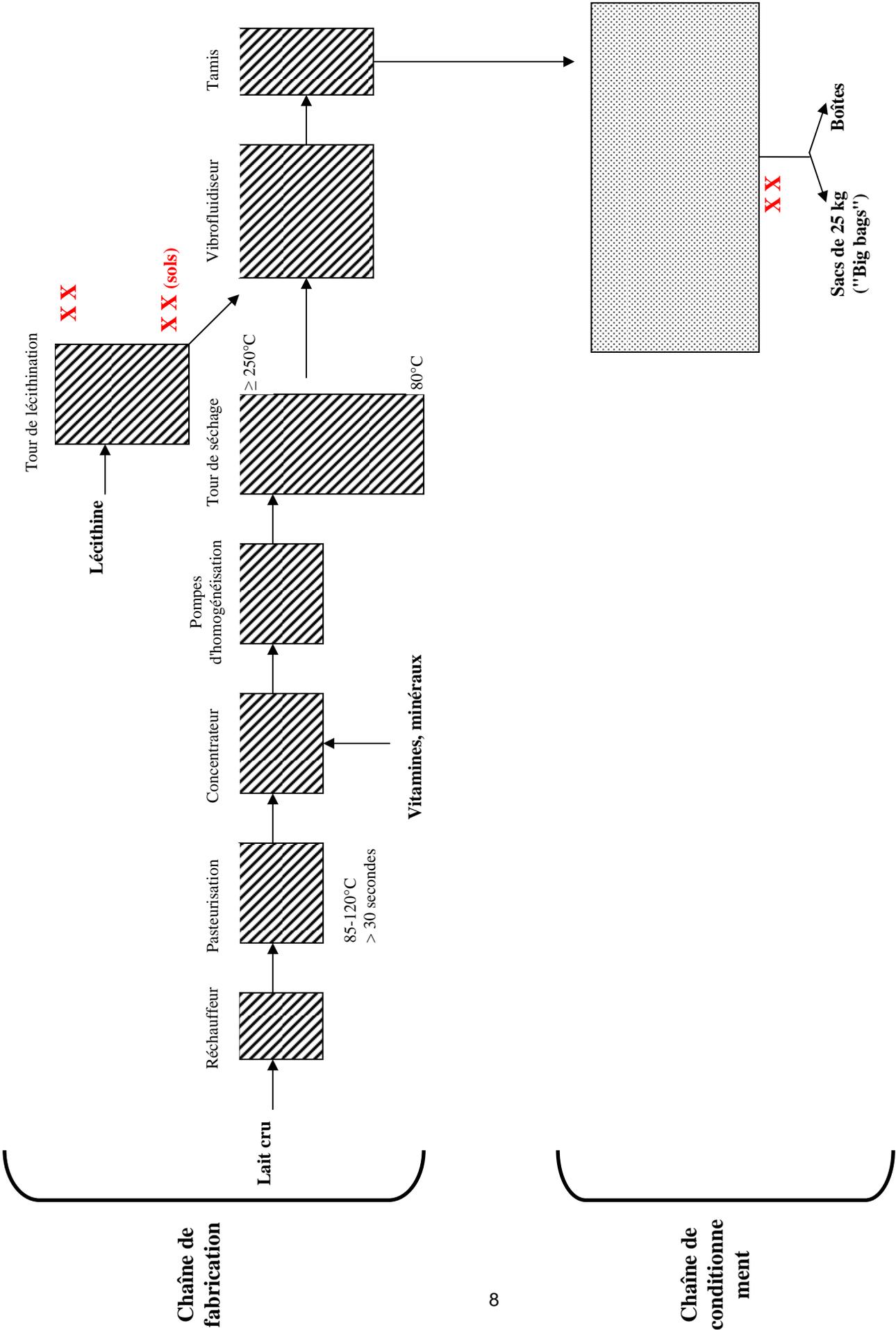
- une boîte de Picot nutrition quotidienne 1^{er} âge fabriquée le 15 juillet 2004 (une prise d'essai positive sur deux prises d'essai de 200g),
- 2 prélèvements de lécithine retrouvée sur le sol,
- 1 prélèvement dans un aspirateur de la tour de lécithination,
- 1 prélèvement dans une cuve de préchauffage de la lécithine,
- 2 prélèvements environnementaux en fin de chaîne de conditionnement (Figure 3).

Tableau 4 : Analyses réalisées sur les poudres de lait infantile de la marque Picot et dans l'environnement de l'entreprise Célia. *Salmonella* Agona, France, janvier-mars 2005

Description du prélèvement	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs pour <i>Salmonella</i> Agona
Matières premières (lactose, maltodextrines, lécithine)	24	0
Poudres de lait en cours de fabrication (début mars 2005 avant désinfection)	6	0
Poudres de lait fabriquées et conditionnées en mars 2005 avant désinfection	102	0
Poudres de lait provenant de l'échantillonnage (fabriquées entre août 2003 et février 2005)	66	1 : boîte de Picot fabriquée le 15 juillet 2004
Poudres de lait de boîtes provenant de familles de nourrissons malades	8 boîtes	0
Environnement des chaînes de fabrication et de conditionnement avant désinfection	420	6 : poste de lécithination (4 échantillons), fin de chaîne de conditionnement (2 échantillons)

Figure 3 : Schéma des chaînes de fabrication et de conditionnement des poudres de lait de l'entreprise productrice Célia

X = 1 prélèvement environnemental positif pour *Salmonella Agona*



3.3 Deuxième phase (semaines 11-21 de l'année 2005)

Enquête descriptive

L'enquête menée auprès des familles des 94 cas dont les signes cliniques étaient apparus entre le 14 mars et le 26 mai 2005 retrouvait que 93 % des nourrissons avaient consommé des poudres de lait infantile de marque Blédilait de la gamme Blédilait 2^{ème} âge au cours des 7 jours ayant précédé l'apparition des signes cliniques (Tableau 5).

Tableau 5 : Fréquences de consommation des aliments consommés par au moins 30 % des nourrissons au cours des 7 jours ayant précédé le début des signes cliniques de salmonellose à *Salmonella Agona*, France, mars-mai 2005

Aliments consommés	Nombre de cas ayant consommé N=94	Proportion de consommateurs (%)
Pots de fruits	57	61
pots de fruits marque B*	52	55
pots de fruits marque N*	30	32
Pots de légumes	46	49
pots de légumes marque B *	39	42
pots de légumes marque N *	23	25
Poudres de lait infantile	94	100
poudres de lait Blédilait	87	93
Blédilait 2 ^{ème} âge	79	91
Blédilait 2 ^{ème} âge + autres	8	9
poudres de lait Gallia	3	3
poudres de lait Picot	1	1
autres poudres de lait	3	3
Eau embouteillée (utilisée pour les biberons)	92	98
eau marque E	64	68

* Certains nourrissons avaient consommé à la fois des petits pots de marque B et de marque N.

Des informations sur les lots de Blédilait 2^{ème} âge ont pu être obtenues pour 62 nourrissons (Tableau 6). Sept lots différents ont été cités, dont 2 par 90 % des familles :

- Blédilait 2^e âge 900g 1231/BL9 DEC 06, consommé par 35 nourrissons (56 %),
- Blédilait 2^e âge 900g 1229/BL7 DEC 06, consommé par 21 nourrissons (34 %).

Tableau 6 : Lots de poudres de lait infantile Blédilait 2^e âge consommés par les cas dans les 7 jours ayant précédé les symptômes de salmonellose à *Salmonella Agona* (pour les 62 cas pour lesquels l'information était connue), France, mars-mai 2005

Numéro de lot	Nombre de consommateurs*
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 1229/BL7 DEC 06	21
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 1231/BL9 DEC 06	35
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 1221/BLX DEC 06	6
Blédilait 2 ^{ème} âge 450g 1210/BLJ DEC06	1
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 289/DNH JANV 07	1
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 290/DNH JANV 07	2
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 295/DFT FEV07	1

* Certains nourrissons avaient consommé des poudres de lait de plusieurs lots différents au cours de 7 jours ayant précédé les signes cliniques.

Enquête sur les poudres de lait Blédilait

L'enquête de la DGCCRF mettait en évidence que l'entreprise Célia avait fabriqué, sur la même chaîne de fabrication que les poudres de lait Picot, 5 lots de poudres de lait infantile pour l'entreprise Blédina en décembre 2004. Ces poudres de lait, livrées en vrac ("big bag"), avaient été conditionnées par l'entreprise Blédina située dans le département du Nord (59) et vendues sous les marques Blédilait 2^{ème} âge et Gallia 2^{ème} âge (Tableau 7). Tous les auto-contrôles réalisés par l'entreprise Blédina sur ces lots étaient négatifs (14 analyses sur 25g pour chaque lot).

Tableau 7 : Lots de poudres de lait infantile fabriqués par l'entreprise Célia pour l'entreprise Blédina. *Salmonella* Agona, France, mars-mai 2005

Lots	Dates de fabrication
Gallia 2 ^{ème} âge 450g 1210/BLJ DEC06	10/12/2004
Blédilait 2 ^{ème} âge 450g 1210/BLJ DEC06	10/12/2004
Gallia 2 ^{ème} âge 900g 1211/BLK DEC06	11/12/2004
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 1221/BLX DEC06	21/12/2004
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 1229/BL7 DEC06	29/12/2004
Blédilait 2 ^{ème} âge 450g 1229/BL7 DEC06	29/12/2004
Blédilait 2 ^{ème} âge 900g 1231/BL9 DEC06	31/12/2004

En outre, les enquêtes de traçabilité des lots 289/DNH, 290/DNH et 295/DFT (consommés par des cas) (Tableau 6) montraient que les lots 289/DNH et 290/DNH avaient été fabriqués et conditionnés par l'entreprise Blédina juste après les lots Blédilait 1229/BL7 et 1231/BL9, avant le nettoyage hebdomadaire et la désinfection mensuelle.

Au cours d'une inspection de l'entreprise Blédina, la DDCCRF 59 a réalisé :

- 25 prélèvements de surface ;
- 4 prélèvements de poudre de lait ;
- 16 prélèvements de boîtes de l'échantillothèque ;
- 6 prélèvements de poudre résiduelle ;
- 20 prélèvements de lots conditionnés après les lots 289 et 290¹.

Tous ces échantillons étaient négatifs pour la recherche de *Salmonella*.

A partir des 27 boîtes de Blédilait ou Gallia prélevées chez les familles des cas, *Salmonella* Agona a été isolée dans 2 boîtes du lot 1229/BL7 et dans 2 boîtes du lot 1231/BL9 (1 à 2 prises d'essai positives sur 10 prises d'essai de 25g) (Tableau 8).

Tableau 8 : Recherches de *Salmonella* Agona dans des boîtes de Blédilait consommées par les cas. *Salmonella* Agona, France, mars-mai 2005

Lots	Nombre de boîtes analysées	Mise en évidence de <i>Salmonella</i> Agona
Blédilait 2 ^{ème} âge 1229/BL7 DEC06	10	2*
Blédilait 2 ^{ème} âge 1231/BL9 DEC06	9	2**
Blédilait 2 ^{ème} âge 1221/BLX DEC06	3	0
Gallia 2 ^{ème} âge 1211/BLK DEC06	1	0
Blédilait 2 ^{ème} âge 289/DNH JAN07	2	0
Blédilait 2 ^{ème} âge 290/DNH JAN07	2	0

*1 positif / 6x25g pour une boîte, 2 positifs / 10x25g pour une boîte.

**1 positif / 10x25g pour les 2 boîtes.

¹ Données communiquées lors des réunions téléphoniques.

3.4 Bilan

Cette épidémie s'est déroulée en deux phases successives (Figure 4) :

- la première phase de fin décembre 2004 à mi-mars 2005 était liée à la consommation de poudres de lait de marque Picot et a concerné 44 cas (Tableau 9) ;
- la seconde phase a débuté au cours de la 4^e semaine de mars et a concerné 92 cas. Elle était liée à la consommation de plusieurs lots de poudres de lait de marque Blédilait / Gallia :
 - o 5 lots fabriqués par l'entreprise Célia et conditionnés par l'entreprise Blédina,
 - o 2 lots fabriqués et conditionnés par l'entreprise Blédina juste après ces 5 lots.

Figure 4 : Distribution hebdomadaire des 141 nourrissons avec une salmonellose à *Salmonella* Agona selon la semaine civile de début des symptômes et selon la marque de poudres de lait infantile consommées dans les 7 jours ayant précédé l'apparition des symptômes, France, janvier-mai 2005

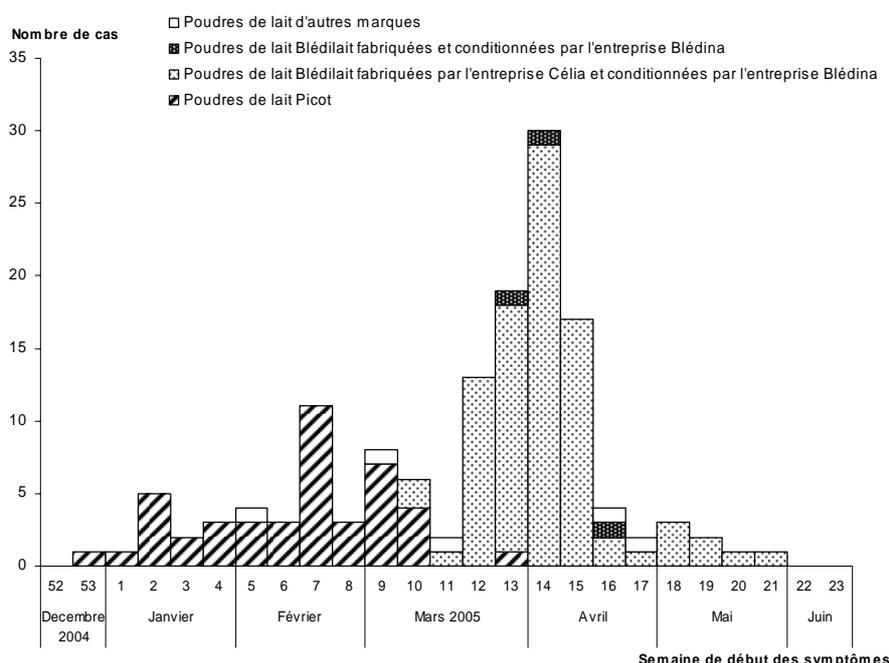


Tableau 9 : Distribution des poudres de lait infantile consommées par les cas au cours des 7 jours ayant précédé le début des signes cliniques de salmonellose à *Salmonella* Agona (n=141 cas), France, janvier-mai 2005

Marque et type de poudres de lait infantile	Nombre de consommateurs N = 141	Proportion de consommateurs parmi les cas (%)
Poudres de lait de marque Picot	44	31
Poudres de lait de marque Blédilait	89	63
Blédilait 2 ^{ème} âge 1229/BL7 DEC 06	21	15
Blédilait 2 ^{ème} âge 1231/BL9 DEC 06	35	25
Blédilait 2 ^{ème} âge 1221/BLX DEC 06	6	4
Blédilait 2 ^{ème} âge 1210/BLJ DEC 06	1	1
Un de ces 4 lots (sans précision du lot)	8	6
Blédilait 2 ^{ème} âge 289/DNH JAN 07	1	1
Blédilait 2 ^{ème} âge 290/DNH JAN 07	2	1
Blédilait 2 ^{ème} âge 295/DFT FEV 07	1	1
Blédilait 2 ^{ème} âge (lots inconnus)	14	10
Poudres de lait de marque Gallia 2 ^{ème} âge	3	2
Autres marques de poudres de lait infantile	5	4

3.5 Enquêtes microbiologiques

Au CNR des *Salmonella*, 11 souches isolées chez des cas "épidémiques" (4 consommateurs de poudres de lait Picot, 7 consommateurs de poudres de lait Blédilait) ont été comparées à 13 souches de *S. Agona* isolées chez des cas "non épidémiques" (8 souches isolées en 2004 chez des enfants de moins de 1 an et 5 souches isolées en 2005 chez des malades de plus de 2 ans) et à une souche isolée de poudres de lait Picot.

Le profil X1 était majoritaire, retrouvé pour 9 des 11 souches (82 %) des cas "épidémiques", 7 des 13 souches (54 %) des cas "non épidémiques" et pour la souche isolée de poudres de lait Picot (Tableau 10).

Parmi les 7 souches isolées chez des cas "non épidémiques" présentant le profil X1, 5 souches avaient été isolées de mai à décembre 2004 chez des nourrissons ayant consommé des poudres de lait Picot au cours des 7 jours ayant précédé l'apparition de leurs signes cliniques (Annexe 3).

Tableau 10 : Pulsotypes des souches de *Salmonella* Agona d'origine humaine, alimentaire et environnementale, France, janvier-mai 2005. Lerqap, Afssa, CNR des *Salmonella*

Pulsotype	Nombre de souches d'origine humaine (n=24)		Nombre de souches d'origine alimentaire Picot (n=1)	Nombre de souches d'origine alimentaire Blédilait (n=5)	Nombre de souches d'origine environnementale entreprise Célia (n=6)
	Cas épidémiques (11)	Cas non épidémiques (13)			
X1	9	7	1	5	6
X2 (proche X1)		1			
X4		1			
X5		1			
X6		1			
X7		1			
X8		1			
X9	1				
X10	1				

Au Lerqap de l'Afssa, le profil de la souche provenant de poudres de lait Picot a été comparé aux profils de 6 souches isolées de l'environnement de l'entreprise Célia, de 5 souches isolées de poudres de lait Blédilait et aux profils référencés dans la base de données des profils moléculaires comprenant 18 souches non reliées et isolées en 2002 et 2003 des filières : alimentation humaine (9 souches), alimentation animale (3 souches), santé et production animale (4 souches) et écosystème (2 souches).

Le profil X1 était retrouvé pour la souche de poudres de lait Picot, les 5 souches de poudres de lait Blédilait, les 6 souches de l'environnement de l'entreprise Célia et une des 18 souches de la base de données de l'Afssa, isolée de l'environnement de l'atelier d'une industrie laitière d'Ille-et-Vilaine (35) en 2002 (Annexe 4).

4. Mesures de contrôle

4.1 Première phase

Le 4 mars 2005, au vu des résultats de l'enquête épidémiologique descriptive qui suspectaient les poudres de lait infantile Picot, l'entreprise Célia procédait par communiqué de presse à un retrait et un rappel de toutes les poudres de lait infantile de la marque Picot vendues en pharmacies et parapharmacies (Figure 5, Annexe 5).

De plus, des poudres de lait infantile fabriquées par l'entreprise Célia étant exportées vers l'Italie, la Finlande et les pays tiers à la Communauté européenne, une information a été faite à tous ces pays par le système d'alerte européen RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) et par Infosan (OMS) (Annexe 5).

La chaîne de fabrication des poudres de lait infantile Picot a été immédiatement arrêtée et un audit a été réalisé par l'Institut Pasteur de Lille dans l'entreprise Célia. Après un nettoyage et une désinfection, la chaîne de fabrication a été remise en marche le 23 mars. Le 30 mars, 4 auto-contrôles de l'environnement de la chaîne de fabrication et de conditionnement (au niveau des sols du laboratoire, sous le poste de lécithination, sous le vibro-fluidiseur et en fin de chaîne de conditionnement) se sont révélés positifs. La chaîne a été de nouveau arrêtée et nettoyée et la production produite entre le 23 mars et le 6 avril a été stockée. Après de nouveaux contrôles qui se sont révélés négatifs, les poudres de lait infantile fabriquées à partir du 14 avril 2005 ont pu être commercialisées.

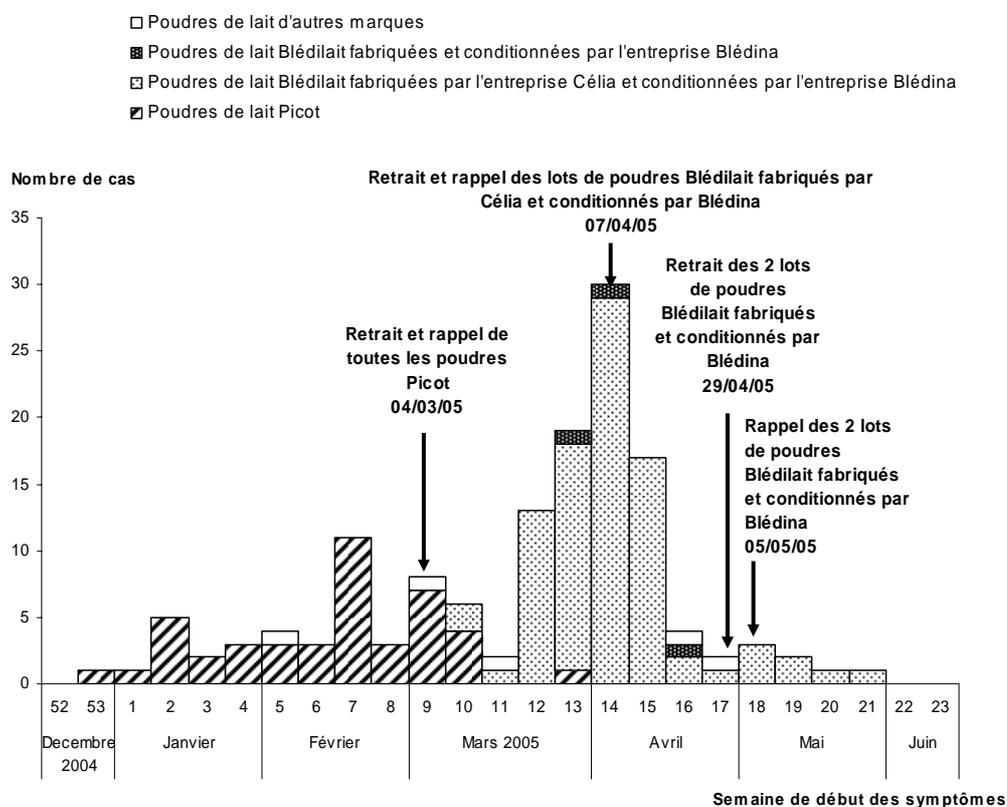
4.2 Deuxième phase

Le 7 avril 2005, au vu des résultats des différentes investigations, l'entreprise Blédina procédait par communiqué de presse à un retrait et un rappel des 5 lots de poudres de lait Blédilait / Gallia 2^{ème} âge produits par l'entreprise Célia, conditionnés par l'entreprise Blédina et vendus en pharmacies et dans les grandes et moyennes surfaces (Annexe 5).

Ces lots de poudres de lait Blédilait étant exportés vers l'Italie et les pays tiers, une information a été faite à ces pays par RASFF et Infosan (OMS)(Annexe 5).

Le 29 avril 2005, des mesures de retrait supplémentaires des 2 lots de poudres de lait infantile Blédilait et Gallia 2^{ème} âge fabriqués et conditionnés par l'entreprise Blédina juste après les 5 lots fabriqués par l'entreprise Célia et conditionnés par l'entreprise Blédina ont été mises en place. Le rappel de ces 2 lots a été réalisé le 5 mai 2005 (Annexe 5).

Figure 5 : Distribution hebdomadaire des 141 nourrissons avec une salmonellose à *Salmonella* Agona selon la semaine de début des symptômes et selon la marque de poudres de lait infantile consommées dans les 7 jours précédant l'apparition des symptômes, France, janvier-mai 2005



5. Discussion

La surveillance des *Salmonella* par le CNR des *Salmonella* a permis de détecter cette épidémie de salmonellose à *Salmonella* sérotype Agona survenue chez des nourrissons en France entre janvier et mai 2005.

Les résultats des différentes investigations montrent que cette épidémie s'est déroulée en deux phases successives et qu'elle est attribuable à la consommation de poudres de lait infantile de deux marques.

La première phase était liée à la consommation de poudres de lait infantile de marque Picot d'après les arguments suivants :

- les résultats de l'enquête cas-témoins, mettant en évidence une association statistiquement significative entre la consommation de poudres de lait infantile Picot et la survenue de la salmonellose,
- l'isolement de *Salmonella* Agona dans un échantillon de poudres de lait Picot et dans des échantillons provenant de l'environnement des chaînes de fabrication et de conditionnement des poudres de lait Picot,
- la similitude des profils des souches d'origine humaine, alimentaire et environnementale,
- l'efficacité des mesures de contrôle (arrêt de la production et retrait et rappel de toutes les poudres de lait infantile Picot) sur la baisse du nombre de cas.

La seconde phase était liée à la consommation de poudres de lait infantile Blédilait/Gallia 2^{ème} âge en raison :

- des résultats de l'enquête de la DGCCRF mettant en évidence que 5 lots de poudres de lait Blédilait/Gallia 2^{ème} âge avaient été fabriqués en décembre 2004 sur la même chaîne de fabrication que les poudres de lait Picot et conditionnés par l'entreprise Blédina et que 2 lots avaient été conditionnés juste après ces 5 lots sur la même chaîne de conditionnement de l'entreprise Blédina,
- de la fréquence de consommation de poudres de lait infantile Blédilait 2^{ème} âge par les cas de la seconde vague (93 %),
- de l'isolement de *Salmonella* Agona dans des boîtes de Blédilait 2^{ème} âge consommées par les cas,
- de la similitude des profils des souches humaines et alimentaires,
- de l'efficacité des mesures de contrôle (retrait et rappel des 5 lots Blédilait/Gallia) sur la diminution du nombre de cas.

La similitude des profils en PFGE des souches isolées des poudres de lait de marque Picot et de marque Blédilait confirme qu'il s'agit bien de la même épidémie.

L'origine de la contamination reste inconnue.

Plusieurs hypothèses semblent plausibles. La contamination des poudres de lait par *Salmonella* Agona pourrait être liée :

- soit à l'arrivée en début de chaîne de fabrication de lait cru contaminé et à des durées et/ou des températures de chauffage insuffisantes lors du processus de pasteurisation. La contamination de lait cru par *Salmonella* est en effet connue [1,2]. Cependant, aucun dysfonctionnement de la chaîne de fabrication n'a été relevé par la DDCCRF ;
- soit à une contamination après pasteurisation du lait à partir de l'environnement de la chaîne de fabrication et/ou de la chaîne de conditionnement ou à partir d'une matière première introduite après pasteurisation du lait (la lécithine par exemple). Des souches de *S. Agona* ont en effet été isolées de divers points de l'environnement des chaînes de fabrication et de conditionnement (poste de lécithination, sol sous le vibrofluidiseur, fin de chaîne de conditionnement).

La contamination des poudres de lait Picot semble relativement ancienne puisqu'une souche de *S. Agona* a été isolée de poudres de lait Picot fabriquées le 15 juillet 2004. De plus, l'interrogatoire des familles de 23 nourrissons, chez lesquels des souches de *S. Agona* avaient été isolées par le CNR des *Salmonella* en 2004, montrait que 18 d'entre eux avaient consommé des poudres de lait infantile Picot. Ces dix-huit nourrissons avaient présenté leurs signes cliniques entre mai et décembre 2004. Cinq souches de *Salmonella* Agona isolées chez six d'entre eux présentaient le profil X1 commun à 82 % des souches humaines épidémiques, à la souche isolée de poudres de lait Picot et aux 6 souches isolées de l'environnement de la chaîne de fabrication de l'entreprise Célia. Ces 5 souches humaines, classées dans le groupe des 13

souches de cas "non épidémiques" expliquaient que près de 54 % d'entre elles présentaient le pulsotype X1.

Par ailleurs, la positivité de quatre autocontrôles de l'environnement des chaînes de fabrication et de conditionnement de l'entreprise Célia après les procédures de nettoyage et de désinfection, ainsi que la contamination croisée de la chaîne de conditionnement de l'entreprise Blédina par l'intermédiaire des 5 lots Blédilait/Gallia fabriqués sur la chaîne de fabrication de l'entreprise Célia et conditionnés par l'entreprise Blédina, confirment une persistance et une résistance des salmonelles dans l'environnement.

Au cours de cet épisode épidémique, les investigations épidémiologiques ont permis d'identifier la source de l'épidémie, de suivre l'efficacité des mesures de contrôle et ainsi, de mettre en évidence et de contrôler rapidement la seconde phase de l'épidémie. Elles se sont révélées plus sensibles que les analyses bactériologiques pour détecter une contamination probablement faible et hétérogène des poudres de lait par *S. Agona* comme en témoigne :

- le faible nombre de cas identifiés par rapport au grand nombre de consommateurs de poudres de lait (particulièrement de marque Blédilait),
- la négativité de tous les auto-contrôles de routine réalisés par les entreprises Célia et Blédina,
- la négativité de la majorité des analyses réalisées dans le cadre de cette investigation (1,5 % d'analyses positives) malgré des recherches nombreuses et ciblées (dans des boîtes de lait consommées par des cas dans les 7 jours ayant précédé l'apparition de leurs signes cliniques) et les moyens techniques mis en œuvre (augmentation du nombre et de la quantité de prises d'essai, diversité des méthodes de détection),
- le taux élevé de prises d'essai négatives pour les échantillons de poudres de lait dans lesquels *S. Agona* a pu être isolée (80 à 90 % pour les poudres de lait Blédilait, 50 % pour les poudres de lait Picot).

Il s'agissait de la première épidémie de salmonellose à *S. Agona* survenant en France. *Salmonella Agona* est néanmoins relativement fréquente en France puisqu'elle fait partie, en 2003 et 2004, des dix souches de *Salmonella* d'origine humaine les plus souvent reçues au CNR des *Salmonella* (70 à 100 souches *S. Agona* par an). Plusieurs épidémies de salmonelloses à *S. Agona* ont été décrites dans d'autres pays. Elles étaient liées à la consommation de lait en poudre [3], de goûter à la cacahuète [4,5], de viande de dinde [6], de céréales à base d'avoine grillée [7] et de tisane à base d'anis et de fenouil [8].

De nombreuses épidémies de salmonelloses liées à la consommation de poudres de lait infantile ont été rapportées depuis les années 1950 chez des nourrissons [2,9-13]. Les *Salmonella* ont en effet la capacité de survivre dans les poudres de lait et de se multiplier rapidement lors de la reconstitution [1,14,15]. Cette aptitude à survivre dans les poudres de lait est liée aux caractéristiques microbiologiques des *Salmonella* :

- elles croissent à des températures comprises entre 5,5 et 45°C [1], les poudres de lait étant probablement stockées à des températures comprises dans cette fourchette,
- elles peuvent s'adapter à la dessiccation, devenir résistantes au stress environnemental comme la chaleur et le manque de nutriments et ainsi survivre pendant de longues périodes dans un environnement sec [16,17]. Dans de telles conditions, elles subissent des dommages métaboliques se manifestant souvent par une inaptitude à former des colonies sur des géloses sélectives [18].

Ces caractéristiques des *Salmonella* expliquent la persistance de la contamination. Associées à une contamination présumée faible et hétérogène, elles sont en partie responsables des difficultés d'isolement constatées au cours de cette épidémie et probablement de la faible fréquence d'isolement des salmonelles dans les poudres de lait : une étude menée sur 141 poudres de lait provenant de 35 pays n'a pas retrouvé *Salmonella* [19] ; dans une autre étude portant sur 200 usines de lait en poudre, 1 % des 3 315 échantillons de produits et 8,2 % des 1 475 échantillons environnementaux étaient contaminés par *Salmonella* [20].

Au cours de nombreuses investigations d'épidémies liées à la consommation de poudres de lait [2,9-12] ou d'autres aliments [4,5,8,21,22], les investigations microbiologiques ont mis en évidence de faibles concentrations de *Salmonella* dans les aliments, suggérant une faible dose infectante. Cette observation concorde avec les résultats d'une revue de 11 épidémies de

salmonelloses montrant que dans 6 épidémies, la dose ingérée estimée était inférieure à 10^3 organismes [23].

Les épidémies associées à de faibles contaminations concernaient en effet essentiellement des nourrissons, des jeunes enfants ou des personnes âgées, qui constituent ainsi probablement des groupes plus à risque vis-à-vis de faibles contaminations alimentaires. Les nourrissons sont particulièrement vulnérables aux pathogènes entériques du fait de facteurs physiologiques telle l'hypochlorhydrie gastrique [23].

Suite à cette épidémie, un groupe de travail de l'Afssa s'est mis en place afin d'améliorer les méthodes de détection des *Salmonella* dans les poudres de lait. Plusieurs protocoles de "réparation de dommages métaboliques" subis par *Salmonella* dans les poudres de lait ont été publiés dans d'autres pays [24-28].

Par ailleurs, du fait de la faiblesse des niveaux de contamination et de son hétérogénéité dans les poudres de lait, il serait également nécessaire de reconsidérer les normes en vigueur. En France, la législation impose l'absence de salmonelles dans 25g de produit fini [29]. Les recommandations actuelles du Codex Alimentarius pour les *Salmonella* sont l'absence d'organismes dans 60 échantillons de 25 grammes chacun [30]. Une réflexion sur les normes imposées aux fabricants est actuellement en cours au niveau européen et international [31,32]. Les conditions de préparation et de conservation des biberons sont prépondérantes pour éviter les contaminations bactériennes et leur multiplication. Lors de cette investigation, les enquêtes épidémiologiques (étude exploratoire et étude cas-témoins) n'ont pas mis en évidence de mauvaises pratiques en termes de préparation et de conservation des biberons. Un tiers des familles de cas ont indiqué ne pas stériliser les biberons, mais leurs méthodes de lavage étaient adéquates. Dans ce cas, selon les recommandations d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons récemment élaborées par l'Afssa [33], la stérilisation n'est pas utile. Enfin, cet épisode épidémique est l'occasion de rappeler que, selon les recommandations de l'OMS [34], l'allaitement maternel constitue la référence pour l'alimentation du nourrisson pendant les premiers mois de la vie. Plusieurs études ont confirmé que l'allaitement maternel a un effet protecteur fort contre la survenue de salmonellose chez le nourrisson [35,36].

6. Références bibliographiques

- [1] Marth EH. *Salmonellae* and salmonellosis associated with milk and milk products. A review. J Dairy Sci 1969;52:283-315.
- [2] Rowe B, Begg NT, Hutchinson DN, Dawkins HC, Gilbert RJ, Jacob M, *et al.* *Salmonella* ealing infections associated with consumption of infant dried milk. Lancet 1987;2:900-3.
- [3] Sramova H, Dedicova D, Petras P, Benes C. Epidemic occurrence of alimentary bacterial infections in the Czech Republic 1979-1989. Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol 1991;40:74-84.
- [4] Killalea D, Ward LR, Roberts D, de LJ, Sufi F, Stuart JM, *et al.* International epidemiological and microbiological study of outbreak of *Salmonella* Agona infection from a ready to eat savoury snack--I: England and Wales and the United States. BMJ 1996;313:1105-7.
- [5] Shohat T, Green MS, Merom D, Gill ON, Reinfeld A, Matas A, *et al.* International epidemiological and microbiological study of outbreak of *Salmonella* Agona infection from a ready to eat savoury snack--II: Israel. BMJ 1996;313:1107-9.
- [6] Synnott MB, Brindley M, Gray J, Dawson JK. An outbreak of *Salmonella* Agona infection associated with precooked turkey meat. Commun Dis Public Health 1998;1:176-9.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Agona infections linked to toasted oats cereal--United States, April-May, 1998. JAMA 1998;280:411.
- [8] Koch J, Schrauder A, Alpers K, Werber D, Frank C, Prager R, *et al.* *Salmonella* Agona outbreak from contaminated aniseed, Germany. Emerg Infect Dis 2005;11:1124-7.
- [9] Park JK, Seok WS, Choi BJ, Kim HM, Lim BK, Yoon SS, *et al.* *Salmonella enterica* serovar London infections associated with consumption of infant formula. Yonsei Med J 2004;45:43-8.
- [10] Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* serotype Tennessee in powdered milk products and infant formula--Canada and United States, 1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993;42:516-7.
- [11] Usera MA, Echeita A, Aladuena A, Blanco MC, Reymundo R, Prieto MI, *et al.* Interregional foodborne salmonellosis outbreak due to powdered infant formula contaminated with lactose-fermenting *Salmonella* Virchow. Eur J Epidemiol 1996;12:377-81.
- [12] Threlfall EJ, Ward LR, Hampton MD, Ridley AM, Rowe B, Roberts D, *et al.* Molecular fingerprinting defines a strain of *Salmonella enterica* serotype Anatum responsible for an international outbreak associated with formula-dried milk. Epidemiol Infect 1998;121:289-93.
- [13] Bornemann R, Zerr DM, Heath J, Koehler J, Grandjean M, Pallipamu R, *et al.* An outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul in a children's hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2002;23:671-6.
- [14] LiCari JJ, Potter NN. *Salmonella* survival differences in heated skim milk and in spray drying of evaporated milk. J Dairy Sci 1970;53:1287-9.

- [15] Collins RN, Treger MD, Goldsby JB, Boring JR, III, Coohon DB, Barr RN. Interstate outbreak of *Salmonella* Newbrunswick infection traced to powdered milk. JAMA 1968;203:838-44.
- [16] Mitscherlich E, Marth EH. Microbial survival in the environment. Springer-Verlag ed. New York: 1984.
- [17] Mattick KL, Jorgensen F, Wang P, Pound J, Vandeven MH, Ward LR, *et al.* Effect of challenge temperature and solute type on heat tolerance of *Salmonella* serovars at low water activity. Appl Environ Microbiol 2001;67:4128-36.
- [18] Hurst A. Bacterial injury: a review. Can J Microbiol 1977;23:935-44.
- [19] Muytjens HL, Roelofs-Willemse H, Jaspar GH. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 1988;26:743-6.
- [20] Schroeder SA. What the sanitarian should know about salmonellae and staphylococci in milk and milk products. J Dairy Food Tech 1967;30:376-80.
- [21] Craven PC, Mackel DC, Baine WB, Barker WH, Gangarosa EJ. International outbreak of *Salmonella* Eastbourne infection traced to contaminated chocolate. Lancet 1975;1:788-92.
- [22] Lehmacher A, Bockemuhl J, Aleksic S. Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. Epidemiol Infect 1995;115:501-11.
- [23] Blaser MJ, Newman LS. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. Rev Infect Dis 1982;4:1096-106.
- [24] Dhiaf A, Chnity N, Bakhrouf A. Fate of *Salmonella* in baby powder milk. Food, Agriculture & Environment 4 A.D.;2:149-50.
- [25] Rocelle M, Clavero S, Beuchat LR. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. Appl Environ Microbiol 1995;61:3268-73.
- [26] Ray B, Jezeski JJ, Busta FF. Repair of injury in freeze-dried *Salmonella* Anatum. Appl Microbiol 1971;22:401-7.
- [27] Ray B, Jezeski JJ, Busta FF. Effect of rehydration on recovery, repair, and growth of injured freeze-dried *Salmonella* Anatum. Appl Microbiol 1971;22:184-9.
- [28] McCleery DR, Rowe MT. Development of a selective plating technique for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after heat stress. Lett Appl Microbiol 1995;21:252-6.
- [29] Arrêté du 1er juillet 1976 relatif aux aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge.
- [30] WHO. Joint FAO/WHO Workshop on *Enterobacter Sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Geneva 5-8 February 2004.
- [31] WHO. Illnesses linked to consumption of powdered infant formula intrinsically contaminated by *Salmonella*. Background paper prepared for the joint FAO/WHO technical meeting on *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. FAO Headquarters, Rome 16-20 January 2006.

- [32] Autorité Européenne de Sécurité des Aliments. Avis du groupe scientifique sur les risques biologiques sur une demande de la Commission relative aux risques microbiologiques dans les préparations pour nourrissons et les préparations de suite. *The EFSA Journal* 2004;1-35.
- [33] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Recommandations d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons. Maisons-Alfort : Agence française de sécurité sanitaire des aliments; 2005 Jul.
- [34] WHO. 54th World Health Assembly. Infant and young child nutrition. WHA 54.2, Geneva 14-20 May 2001.
- [35] Rowe SY, Rocourt JR, Shiferaw B, Kassenborg HD, Segler SD, Marcus R, et al. Breast-feeding decreases the risk of sporadic salmonellosis among infants in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* 2004;38 Suppl 3:S262-S270.
- [36] Haddock RL, Cousens SN, Guzman CC. Infant diet and salmonellosis. *Am J Public Health* 1991;81:997-1000.

7. Annexes

Annexe 1 : questionnaire

Institut de veille sanitaire, 12 rue du Val d'Osne, 94415 St-Maurice Cedex
Tél : 01.41.79.67.00 Télécopie : 01.41.79.67.69

QUESTIONNAIRE EXPLORATOIRE EPIDEMIE A SALMONELLA AGONA - 2005

Le questionnaire concerne une personne malade et ses témoins

Laboratoire : adresse Téléphone :

Date d'isolement : ___/___/___ Prélèvement de : selles sang autres préciser :

Nom médecin traitant : Téléphone médecin :

.....

Nom de l'enquêteur (Institution) : Date : ___/___/___

Personne interrogée : malade membre de la famille préciser : autre préciser :

Numéro d'identification du patient ou de son témoin : _____

NOM : ___ __ __ Prénom : Date de naissance (ou âge) : Sexe : M F
(3 premières lettres)

Téléphone :

Code postal du domicile :

Commune :

SIGNES CLINIQUES AU COURS DE L'EPISODE DE SALMONELLOSE : OUI NON

	OUI	NON	NSP
Date de début : ___/___/___			
Fièvre >38°C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nausées	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vomissements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Douleurs abdominales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diarrhée (selles liquides)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nombre max. de selles/jour :			Durée (en jours) :
Sang dans les selles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autres signes cliniques (préciser) :			

Avez-vous consulté un médecin pour ces problèmes ? OUI NON NSP

Hospitalisation : OUI NON Si OUI, Hôpital
Service :
Date d'hospitalisation : ___/___/___
Date de sortie : ___/___/___

Décès : OUI NON Si OUI, date du décès : ___/___/___
Cause du décès :

TERRAIN

Êtes-vous (ou votre enfant) atteint d'une maladie chronique ? : OUI NON NSP

Si OUI, la(les)quelle(s) :

Prenez-vous (ou votre enfant) un ou des traitements au long cours ? OUI NON NSP

Anti-acides ou anti-ulcéreux

Corticoïdes (Cortisone)

Autre traitement prolongé

Si OUI, lequel :

Avez-vous (ou votre enfant) pris des antibiotiques dans le mois précédant la maladie ? OUI NON NSP

Si OUI, lesquels :

Avez-vous (ou votre enfant) pris des produits issus de la phytothérapie, homéopathie, médecine traditionnelle dans le mois précédant la maladie ? OUI NON NSP

Si OUI, lesquels :

CAS DANS L'ENTOURAGE

Combien de personnes habitent dans le foyer familial ? _____

Un (des) cas de diarrhée est-il (sont-ils) survenu(s) dans le foyer familial dans les 7 jours précédant ou suivant le début de vos signes ? OUI NON NSP

Si OUI, - nombre de cas de diarrhée (exclus le cas interrogé) : _____

- au même moment (3 jours avant à 3 jours après)
- 7 jours avant la maladie (3 à 10 jours avant)
- 7 jours après la maladie (3 à 10 jours après)

Cas n°	Age (ans)	Sexe (M/F)	7 jours précédant*	Même moment*	7 jours suivant*	Symptômes [§]

* cocher la case et préciser la date de début des signes si connue

§ Fièvre (F), Nausées (N), Vomissements (V), Douleurs abdominales (DA), Diarrhée (D), Diarrhée sanglante (DS), Autres signes (A)

Avez-vous (ou votre enfant) eu un contact avec quelqu'un d'autre présentant de la diarrhée dans les 7 jours précédant le début de vos signes (autre que la famille) ? OUI NON NSP

Si OUI, préciser qui ?

où (collectivité, événements,...)

si collectivité : précisez le nom et l'adresse :

.....

Le questionnaire suivant doit porter sur l'alimentation dans les **7 JOURS PRECEDANT** les symptômes

Période d'exposition : du ___/___/___ au ___/___/___

REPAS PRIS HORS DU DOMICILE

Avez-vous (ou votre enfant) pris un repas en dehors de votre domicile (crèche, halte garderie) dans la semaine précédant le début des signes cliniques ?

OUI NON NSP

Si OUI, préciser le type d'établissement :

la (les) date(s) :

le(s) lieu(x) :

.....

.....

les aliments consommés :

.....

.....

.....

ALIMENTS POUR BEBES

LIEUX D'ACHAT OU DE CONSOMMATION (restaurant, cantine...) : préciser le nom et la ville

1 : _____ 3 : _____

2 : _____ 4 : _____

*Pour le conditionnement, indiquer l'initiale : Pré-(E)mballé, Fabrication (M)aison

	OUI	NON	NSP	Conditionnement* E/M	Lieu d'achat ou de consommation (si différent du numéro de la liste)	Marque et Type
Petits pots légumes <i>préciser</i>						
Petits pots légumes + viandes <i>préciser</i>						
Soupes						
Purée de légumes frais						
Petits pots aux fruits <i>préciser</i>						
Desserts <i>préciser</i>						
Autre <i>préciser</i>						

PRODUITS LAITIERS

LIEUX D'ACHAT OU DE CONSOMMATION (restaurant, cantine...) : *préciser le nom et la ville*

1 : _____ 3 : _____

2 : _____ 4 : _____

Avez-vous (ou votre enfant) bu du **lait** (thé, café, céréales...) ? OUI NON NSP

Si OUI, *préciser* : lait cru (de la ferme) lait UHT lait pasteurisé lait en poudre

lait maternisé lait 2^{ème} age NSP

Si lait maternisé, précisez la marque et le lieu et date d'achat :

.....

.....

PRODUITS CARNES : BOEUF, VOLAILLE, CHARCUTERIE

**Pour le conditionnement, indiquer l'initiale : Pré-(E)mballé, à la (C)oupe, Fabrication (M)aison, (S)urgelé*

	OUI	NON	NSP	Conditionnement* E/C/M/S	Lieu d'achat ou de consommation (si différent du numéro de la liste)	Marque et Type
CHARCUTERIE <i>préciser</i>						
BOEUF						
Steak haché de bœuf Saignant ou cru : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>						
PORC : <i>préciser</i>						
VEAU : <i>préciser</i>						
POULET : <i>préciser</i>						
DINDE : <i>préciser</i>						
POISSON : <i>préciser</i>						
OEUFS : <i>préciser</i>						

GATEAUX, FRIANDISES / ENCAS

*Pour le conditionnement, indiquer l'initiale : (M)aison, (S)urgelé, (T)raiteur, Pré(E)mballé

	OUI	NON	NSP	Conditionnement* M/S/T/E	Lieu d'achat ou de consommation	Marque et type
DESSERTS						
Pâtisseries : préciser						
Glaces ou sorbet : préciser.....						
Autres : préciser						
FRIANDISES						
Chocolat						
Gâteaux secs						
Bonbons						
CEREALES : préciser.....						
AUTRES ALIMENTS : préciser.....						
.....						
.....						

BOISSONS

*Pour le conditionnement, indiquer l'initiale : (F)rais, (P)rêt à l'emploi, (C)onserve, (S)urgelé

	OUI	NON	NSP	Conditionnement* F/P/C/S	Lieu d'achat ou de consommation (si différent du numéro de la liste)	Marque et type
EAU						
Eau embouteillée						
Eau du robinet						
Eau d'une source naturelle						
JUS DE FRUITS						
Orange						
Pomme						
Autres : préciser						
.....						
Tisane ou thé pour enfants						
Autre boisson pour enfants avec des plantes						

Préparation des biberons

Quantité de poudre utilisée :

Marque d'eau :

Quantité de lait reconstitué :

Préparation avec eau chaude ou eau froide :

Nombre de biberons par jour :

Type de biberon (marque) :

Type de tétine (silicone, caoutchouc, etc.) :

Méthode de lavage du biberon avant stérilisation :

Méthode de stérilisation des biberons :

Chauffage des biberons (micro-onde, bain-marie, chauffe-biberon) :

Préparation de biberons en avance (oui /non)

Si oui, conservation au frigo

Si oui, délai avant utilisation

Annexe 2 : analyses sur les poudres de lait infantile de marque Picot

	Nature des prélèvements	Date prélèvements	Prises d'essai / Méthode d'analyse	Mise en évidence de <i>Salmonella</i> Agona
Prélèvements et analyses réalisés par DDCCRF 53 et 35	11 échantillons de produits finis de différentes gammes (dates de fabrication : du 10/09/03 au 17/02/05)	08/03/05	10 x 25 g Méthode de référence ISO6579	0/11
	24 échantillons de matières premières : 4 échantillons de lactose et maltodextrines + 20 échantillons de lécithine	08/03/05 : 4 échantillons 15/03/05 : 20 échantillons de lécithine	10 x 25 g Méthode de référence ISO6579	0/24
	6 échantillons de produits en cours de fabrication	08/03/05	10 x 25 g Méthode de référence ISO6579	0/6
	40 échantillons de l'environnement	08/03/05 : 22 échantillons 15/03/05 : 18 échantillons de l'environnement du poste de lécithination	10 x 25 g Méthode de référence ISO6579	Prélèvements du 08/03/05 : 2 positifs/22 : - tâche de lécithine sur le sol résultant d'une fuite d'une pompe - poussières prélevées dans un aspirateur au 3 ^{ème} étage de la tour de lécithination Prélèvements du 15/03/05 : 2 positifs/18 : - tâche de lécithine sur le sol résultant d'une fuite d'une pompe - couvercle d'une cuve de préchauffage de la lécithine
	8 boîtes de lait prélevées dans 5 familles de nourrissons malades		Par fraction de 25g 3800 g analysés Méthode de référence ISO6579	0/8
	55 analyses de boîtes provenant de l'échantillothèque fabriquées entre août 2003 et février 2005		2 x 200 g Méthode AOAC	1 boîte de Picot Nutrition quotidienne 1^{er} âge fabriquée le 15/07/04 positive : 1/200g : positive 1/200g : négative
142 analyses de poudre en sortie de tour	Semaines 10 et 11 : 44 analyses Semaines 12 et 13 : 98 analyses (14 lots)	Semaines 10 et 11 : 1 x 200 g Semaines 12 et 13 : 7 x 225 g Méthode AOAC	0/142	
128 analyses de poudre après conditionnement	Semaines 10 et 11 : 58 analyses Semaines 12 et 13 : 70 analyses (10 lots)	Semaines 10 et 11 : 1 x 200 g Semaines 12 et 13 : 7 x 225 g Méthode AOAC	0/128	
452 analyses de l'environnement de la tour de séchage*	Semaine 10 : 100 analyses sur tour à l'arrêt, en lavage et au	Méthode AOAC	6 échantillons positifs/452 - 1 échantillon provenant de la manchette de remplissage des	

		<p>démarrage</p> <p>Semaine 11 : 105 analyses (dont 26 sur des points au contact des poudres) en cours de process</p> <p>Semaine 12 : 12 analyses en cours de lavage et 66 analyses (dont 27 sur des points au contact des poudres) en cours de process</p> <p>Semaine 13 : 43 analyses (dont 10 sur des points au contact des poudres) en cours de lavage et 61 analyses (dont 24 sur des points au contact de les poudres) en cours de process</p> <p>Semaine 14 : 65 analyses (dont 23 sur des points au contact des poudres) en cours de process</p>		<p>tôtes prélevé en semaine 10</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 échantillon provenant de l'aspirateur de dessus de tête prélevé en semaine 10 - 1 échantillon provenant du sol sous le vibro-fluidiseur prélevé en semaine 12 (en cours de lavage) - 1 échantillon provenant du sol du laboratoire prélevé en semaine 13 (en cours de lavage) - 1 échantillon provenant du sol sous la lécithination prélevé en semaine 13 (en cours de lavage) - 1 échantillon provenant du sol au remplissage des tôtes prélevé en semaine 13 (en cours de lavage)
	<p>325 analyses de l'environnement du mélange à sec, de l'emboîtement et de l'ensachage</p>	<p>Semaine 10 : 140 analyses sur atelier à l'arrêt après nettoyage et en cours de process</p> <p>Semaine 11 : 35 analyses (dont 14 sur des points au contact des poudres) en cours de process et après nettoyage</p> <p>Semaine 12 : 38 analyses (dont 15 sur des points au contact des poudres) en cours de process et après nettoyage</p> <p>Semaine 13 : 76 analyses (dont 27 sur des points au contact des poudres) en cours de process et après nettoyage</p> <p>Semaine 14 : 36 analyses (dont 22 sur des points au contact des poudres) en cours de process et après nettoyage</p>	<p>Méthode AOAC</p>	<p>0/325</p>

** Pour une meilleure détection de salmonelle et selon les recommandations de l'Institut Pasteur de du laboratoire de la DGCCRF de Rennes, une partie des prélèvements (notamment les sols et quelques matériels) ont été réalisés pendant la phase humide du lavage avant mise en chauffe de la tour de séchage.*



Salmonelloses à *S. enterica* sérotype Agona chez des nourrissons (2004-2005)

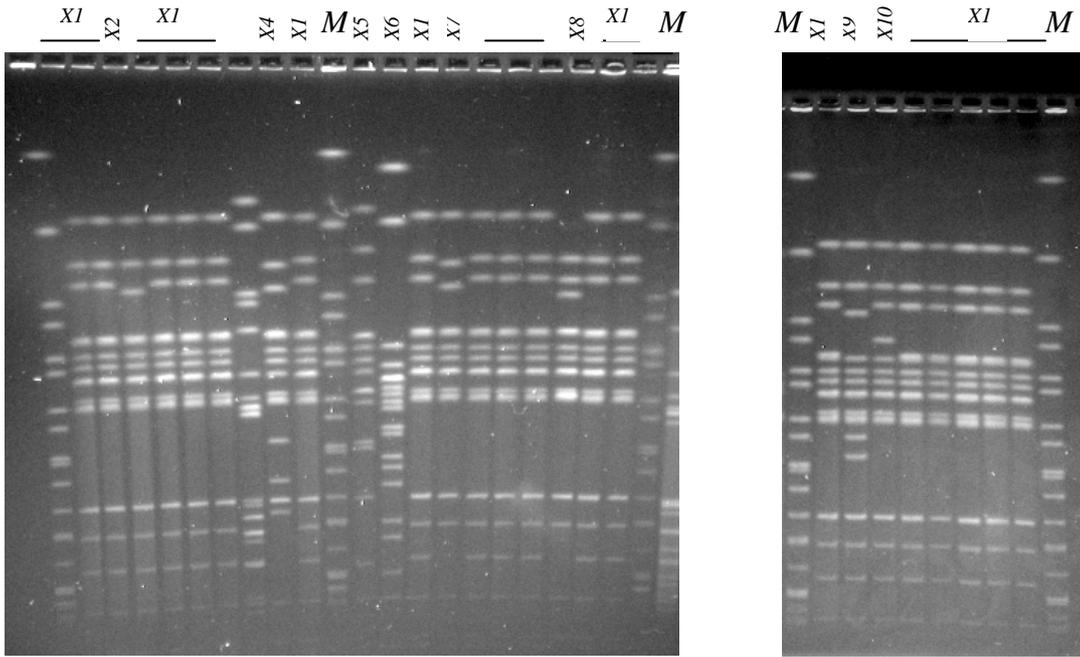
Résultats du sous-typage moléculaire des souches (15-04-05)

Méthode mise en œuvre par le CNR :

Electrophorèse en champ pulsé (*XbaI*) avec conditions de migration et marqueur PulseNet

Résultats de l'analyse par électrophorèse en champ pulsé (*XbaI*)

Numéro de souche	Année d'isolement	Age	Poudres de lait consommées	Pulsotype
n°CNR 04-3162	2004	<1 an	Picot	X1
n°CNR 04-4547	2004	<1 an	Nutricia	X1
n°CNR 04-4722	2004	<1 an	Picot	X2
n°CNR 04-5972	2004	<1 an	Picot	X1
n°CNR 04-7326	2004	<1 an	Picot	X1
n°CNR 04-8279	2004	<1 an	Picot	X1
n°CNR 04-8738	2004	<1 an	Candia	X4
n°CNR 04-9457	2004	<1 an	Picot	X1
n°CNR 05-0428	2005	2 ans	-	X5
n°CNR 05-0507	2005	adulte	-	X6
n°CNR 05-0509	2005	<1 an	Picot	X1
n°CNR 05-0611	2005	10 ans	-	X7
n°CNR 05-0829	2005	<1 an	Picot	X1
n°CNR 05-0834	2005	5 ans	-	X1
n°CNR 05-0948	2005	<1 an	Picot	X1
n°CNR 05-0960	2005	adulte	-	X8
n°CNR 05-1385	2005	<1 an	Picot	X1
n°CNR 05-1504	Poudre de lait Picot (souche AFSSA 1540)			X1
n°CNR 05-1599	2005	<1 an	Blédilait	X9
n°CNR 05-1600	2005	<1 an	Blédilait	X10
n°CNR 05-1623	2005	<1 an	Blédilait	X1
n°CNR 05-1632	2005	<1 an	Blédilait	X1
n°CNR 05-1678	2005	<1 an	Blédilait	X1
n°CNR 05-1804	2005	<1 an	Blédilait	X1
n°CNR 05-1823	2005	<1 an	Blédilait	X1



M, *Salmonella enterica* sérotype Braenderup H9812, marqueur de taille. X1-X10, profils obtenus.

Analyse des résultats :

La souche 05-1504 transmise par l'AFSSA et isolée dans l'environnement de l'usine possède le même profil (X1) en électrophorèse en champ pulsé (avec l'enzyme *Xba*I) que la majorité des souches épidémiques. Le profil X1 est également très proche des profils X2 et X7.



**Investigations microbiologiques menées par
le Lerqap dans le cadre du signalement de
cas groupés de salmonellose à *S. Agona* en
relation avec la consommation de poudre
de lait infantile**

**AFSSA LERQAP
Mars-Juin 2005**

Rédacteurs :

Anne BRISABOIS – Unité CEB

Annaëlle KEROUANTON-LE GALL - Unité CEB- Equipe Typage moléculaire

Laetitia PETIT - Unité CEB- Equipe Typage moléculaire

I. Contexte

Début mars 2005, l'InVS a signalé à l'AFSSA Lerqap, la survenue d'un nombre inhabituel de cas de salmonelloses à *Salmonella* Agona, chez des nourrissons. L'enquête épidémiologique a établi une corrélation entre ces infections et la consommation de laits de marque Picot. Après le retrait et le rappel des produits concernés, une seconde bouffée de cas épidémique est apparue en lien avec la consommation de lots de poudre de lait de marque Blédilait/ Gallia fabriqués dans le même établissement que les poudres de lait Picot et un rappel de tous ces lots a eu lieu. D'autres cas sont ensuite apparus liés à la consommation de 2 autres lots de poudre de lait de marque Blédilait conditionnés dans l'usine Blédina juste après les lots contaminés aient été retirés du marché.

Au total, 143 cas de salmonellose à *S. Agona* ont été notifiés chez des nourrissons entre le 28 décembre 2004 et le 11 mai 2005.

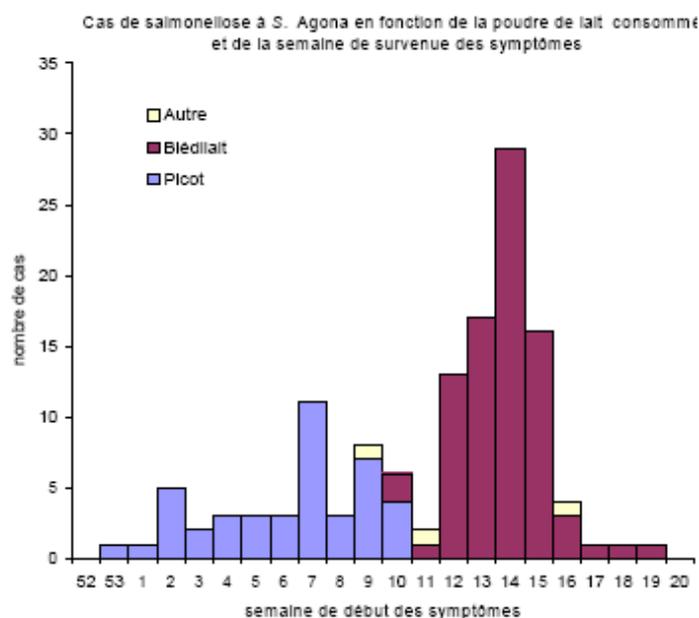


Figure 1 : Distribution des cas , source InVS

Devant cette situation, l'AFSSA Lerqap a été sollicitée :

- d'une part pour la réalisation du typage moléculaire des souches isolées de poudre de lait et la comparaison des profils au sein de la base de données nationale et avec ceux des souches humaines,
- d'autre part, devant les difficultés d'isolement de souches par les méthodes classiques de détection des salmonelles dans les aliments, des travaux complémentaires pour la recherche des salmonelles dans les poudres de lait ont été initiés en utilisant plusieurs méthodes de détection reposant sur des principes différents et en particulier la détection par amplification génique (PCR).

II. Caractérisation moléculaire des souches de *S.Agona* – Unité CEB

II.1. Souches étudiées (Tableau 1)

Quinze souches de *Salmonella*, isolées d'environnement des usines de fabrication de la poudre de lait ou d'échantillons de poudre de lait suspectés, ont été reçues afin de réaliser la détermination du sérotype et une caractérisation moléculaire par électrophorèse en champ pulsé. Les profils PFGE obtenus ont été comparés à ceux de 18 souches de même sérotype Agona de différentes origines, et supposées non reliées épidémiologiquement qui ont été enregistrées dans la base de données nationale en cours de constitution dans le cadre d'un programme AQS. Ces souches ont été collectées par le réseau *Salmonella* entre le 1^{er} juillet 2002 et le 31 décembre 2003 et sont représentatives des 17 profils PFGE déjà identifiées pour ce sérotype.

II.2. Méthodes de caractérisation

L'Unité d'épidémiologie bactérienne de l'AFSSA a réalisé d'une part le sérotypage des souches par la méthode d'agglutination à l'aide des différents sérums dirigés contre les antigènes somatiques et flagellaires de *Salmonella* (BioRad). Puis, la caractérisation par électrophorèse en champ-pulsé (PFGE) a été réalisée sur l'ensemble de ces souches, soit 33 souches au total. Les souches ont été caractérisées par PFGE après extraction de l'ADN total et digestion par l'enzyme *Xba*I, suivant un protocole standardisé et développé spécifiquement pour ce pathogène, sous assurance qualité. Après migration, les fragments d'ADN ont été révélés au bromure d'éthidium. L'analyse des profils génomique est réalisée à l'aide du logiciel Bionumerics et la comparaison des profils se fait par la construction de dendrogramme obtenu après comparaison des coefficients de Dice de chaque profil différents par la méthode UPGMA. A chaque profil différent est attribué un numéro selon une nomenclature préconisée dans les réseaux européens de typage de souches de salmonelles.

Tableau I : Souches de *Salmonella* Agona caractérisées par PFGE et résultats de caractérisation (AH: Alimentation humaine, AA: Alimentation animale, SPA: Santé et production animale, E: écosystème)

N°souche	Origine	Secteur	Département	Profil XbaI
02EB6170SAL	Environnement usine aliment	AH	Hors France	SAGOXB0001
02EB6174SAL	Environnement Atelier Laitier	AH	Hors France	SAGOXB0004
02EB6653SAL	Environnement Atelier Laitier	AH	35	SAGOXB0003
02EB7202SAL	Coproculture de Pintade	SPA	53	SAGOXB0013
02EB12226SAL	Environnement Atelier Laitier	AH	35	SAGOXB0011
02EB12576SAL	Environnement Elevage Poule	SPA	26	SAGOXB0006
02EB13963SAL	Viande volaille	AH	44	SAGOXB0008
03EB205SAL	Aliment pour animaux	AA	56	SAGOXB0012
03EB340SAL	Viande sanglier	AH	95	SAGOXB0018
03EB768SAL	Viscères poulet	SPA	26	SAGOXB0009
03EB1220SAL	Aliment pour animaux	AA	Hors France	SAGOXB0005
03EB4686SAL	Boues Emissaire côtier	E	14	SAGOXB0017
03EB5861SAL	Viande boeuf bourguignon cru	AH	Hors France	SAGOXB0010
03EB8744SAL	Epaule de cochon	AH	1	SAGOXB0002
03EB8810SAL	Produit Laitier	AH	69	SAGOXB0016
03EB9121SAL	Environnement Elevage poulet	SPA	85	SAGOXB0007
03EB10051SAL	Eau de rivière	E	14	SAGOXB0007
03EB11895SAL	Aliment pour animaux	AA	56	SAGOXB0014
05CEB1423SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	35	SAGOXB0003
05CEB1424SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	35	SAGOXB0003
05CEB1540SAL	Poudre de lait infantile	AH	53	SAGOXB0003
05CEB1541SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	53	SAGOXB0003
05CEB1542SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	53	SAGOXB0003
05CEB1574SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	53	SAGOXB0003
05CEB1575SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	53	SAGOXB0003
05CEB2331SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	53	SAGOXB0003
05CEB2332SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	53	SAGOXB0003
05CEB2333SAL	Environnement d'atelier laiterie	AH	53	SAGOXB0003
05CEB3003SAL	Poudre de lait infantile	AH	35	SAGOXB0003
05CEB3004SAL	Poudre de lait infantile	AH	35	SAGOXB0003
05CEB3005SAL	Poudre de lait infantile	AH	35	SAGOXB0003
05CEB3465SAL	Poudre de lait infantile	AH	35	SAGOXB0003
05CEB3466SAL	Poudre de lait infantile	AH	35	SAGOXB0003

II.3. Résultats

Sérotypage : Toutes les souches reçues liées à cette investigation appartenaient au sérotype Agona.

PFGE : Les souches isolées lors de la TIAC ont toutes présentées le profil SAGOXB0003 (Fig.2). Ce profil n'avait été jusqu'à présent identifié que pour 3 souches isolées d'environnement laitier en 2002. Les autres souches non reliées ont présenté 16 autres profils (Fig 3).

Une souche présentant le profil type SAGOXB0003 impliqué dans cette épidémie a été transmis au CNR des *Salmonella* afin de le comparer aux profils des souches isolées des cas et a permis de montrer que les profils des souches humaines étaient majoritairement identiques à celles isolées de poudres de lait ou d'environnement. Les résultats sont également récapitulés dans le tableau I.

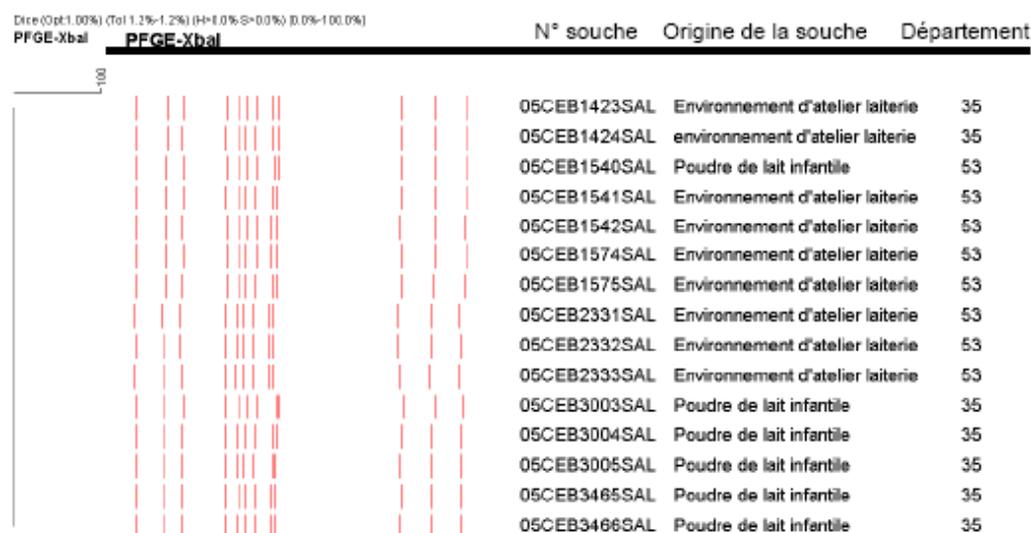


Figure 2. Dendrogramme obtenu après comparaison des profils PFGE des 15 souches de *Salmonella Agona* étudiées dans le cadre de la TIAC.

II.4. Conclusion

Cette étude a permis de confirmer que les profils PFGE des souches de *S. Agona*, isolées de poudres de lait infantile contaminées et d'environnement d'usine de fabrication de poudre de lait infantile, étaient tous identiques. Ces profils étaient également ceux retrouvés pour la majorité des souches isolées des cas humains. Les travaux ultérieurs de constitution de la base de données ont montré que la méthode utilisée présentait un bon pouvoir discriminant puisqu'une grande diversité de profils a été obtenue pour les souches d'origine diverse non reliées (16 profils) permettant ainsi l'exploitation de la base avec un gain de temps considérable dans l'investigation moléculaire.

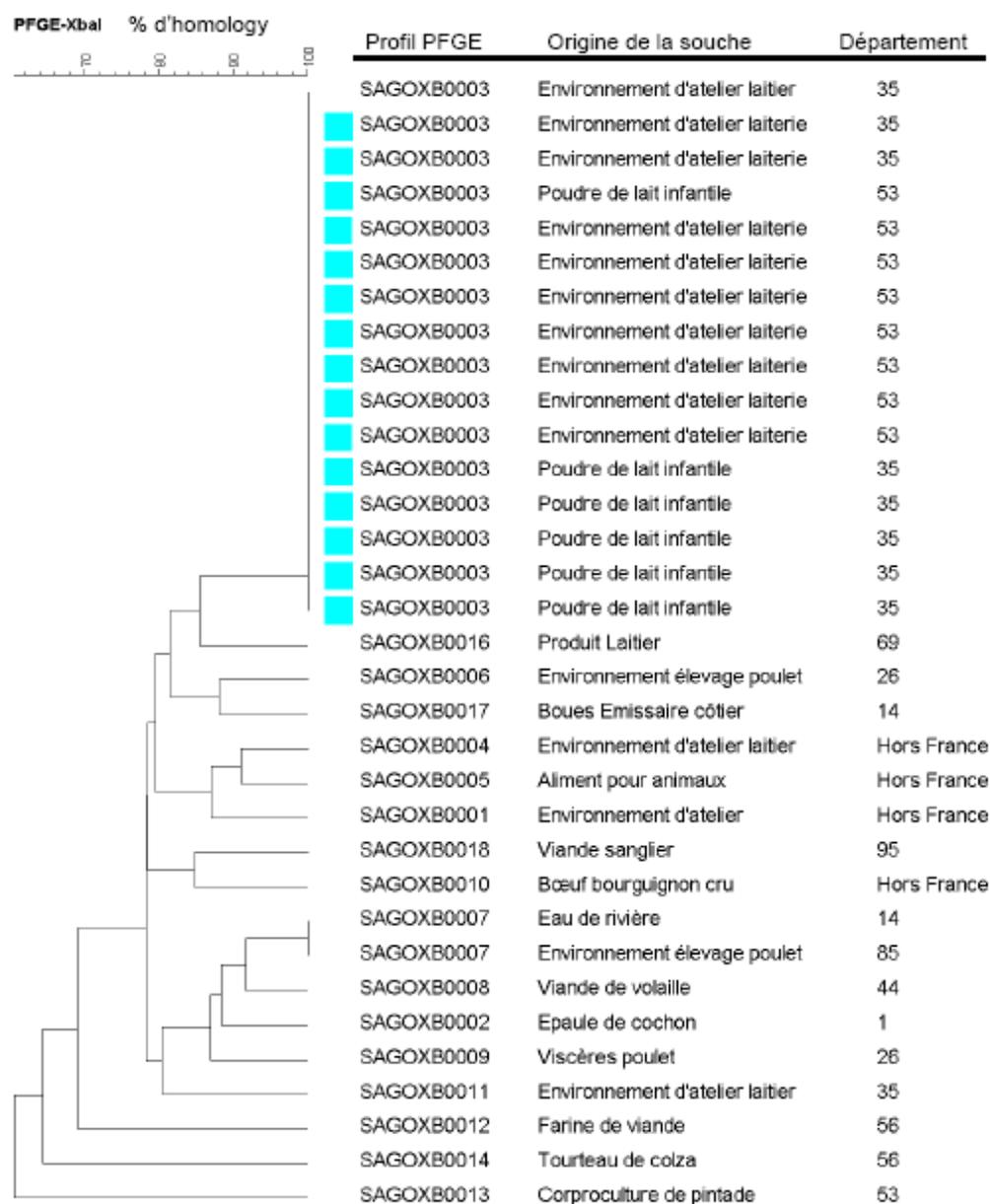


Figure 3. Dendrogramme obtenu après comparaison des profils PFGE des 15 souches de *Salmonella Agona* étudiées dans le cadre de la TIAC (■), comparés à ceux des souches non reliées, d'origine alimentaire ou animale, reçues par le réseau *Salmonella* en 2002 et 2003

III. Recherche de *Salmonella* dans les poudres de lait: Unités CEB, CHPL et SRPI

III.1 Echantillons reçus (Tableau 2)

Devant la fréquence de d'analyses négatives pour la recherche de salmonelles dans les échantillons de poudre de lait alors que le nombre de cas continuait à progresser, il a été décidé lors des réunions téléphoniques, de l'envoi d'échantillons de poudre de lait au Lerqap, afin de réaliser des analyses complémentaires de détection des salmonelles, notamment par les techniques de PCR. C'est ainsi que 66 échantillons au total ont été analysés au Lerqap. Les échantillons suivants ont donc été transmis par différents laboratoires ou instituts pour effectuer la recherche de salmonelles :

- 15 échantillons provenant de l'usine « Célia » et transmis par le laboratoire de la Dgccrf de Rennes
- 42 échantillons provenant de l'usine « Blédina » et transmis par le laboratoire de la Dgccrf de Lille
- 3 échantillons nous ont été transmis par l'InVS et provenaient directement des particuliers ayant un cas dans leur entourage
- 6 échantillons ont été prélevés au hasard en grande surface et correspondaient à des échantillons « témoins ».

III.2 Méthodes de détection (Tableau 2)

Plusieurs méthodes de détection ont été appliquées simultanément à ces échantillons, il s'agit :

- de la méthode de référence NF EN ISO 6579 comprenant des phases de pré-enrichissement et d'enrichissements sélectifs suivies d'isolement sur milieux gélosés permettant l'identification de colonies caractéristiques
- de la méthode FIL modifiée appliquée initialement par le laboratoire de la Dgccrf de Rennes qui consiste à réaliser un pré-enrichissement en eau distillée supplémentée en vert brillant (dilution au 1/5^{ème}) suivie de la procédure habituelle d'analyse selon cette norme.
- de méthodes alternatives validées AFNOR pour la détection des salmonelles ; ces méthodes immuno-enzymatiques sont de type ELISA, VIDAS SLM et VIDAS ICS qui consiste à réaliser une phase d'immunoconcentration de l'échantillon avant la réalisation du test VIDAS.
- de méthodes utilisant le principe de la PCR : PCR-ELISA et PCR en temps réel (PCR-TR), ces méthodes sont basées sur l'amplification d'une séquence du gène *invA* spécifique des salmonelles. Ces méthodes PCR ont été validées au cours d'essais multicentriques dans le cadre d'un programme européen Food-PCR et leurs performances ont fait l'objet d'une publication scientifique. L'ensemble des protocoles détaillés des méthodes PCR utilisées dans le cadre de cette étude figure en Annexe I.

Le tableau 2 ci dessous récapitule les échantillons analysés ainsi que les méthodes mises en œuvre pour ces échantillons.

Tableau 2 : origine des échantillons et méthodes d'analyses mises en œuvre

(les cases grisées correspondent aux méthodes d'analyse réalisées sur les échantillons)

Origine	Date	Nombre	Méthodes bactériologiques		Méthodes alternatives			Méthodes de détection par biologie moléculaire	
			Ref	FIL	VIDAS ICS	VIDAS SLM	ELISA	PCR-ELISA	PCR-TR
DGCCRF Rennes Usine Célia (15 échantillons)	18/04	2		DGCCRF					
	29/04	9		DGCCRF					
	09/05	4		DGCCRF					
DGCCRF Lille Usine Blédina (42 échantillons)	29/04	20							
	12/05	16							
	12/05	6							
Particulier avec un cas ayant consommé (3 échantillons)	06/05	1							
	10/05	1							
	19/05	1							
Témoin Prélèvements d'autres marques en grandes surfaces (6 échantillons)	09/05	5							
	12/05	1							

III.3 Résultats et interprétation (Annexe II et tableau 3)

L'ensemble des résultats détaillés figurent en Annexe II et la synthèse des résultats figure dans le tableau 3 ci dessous.

Analyse des résultats des 60 échantillons reliés à l'investigation

Aucun échantillon de poudre de lait n'a été trouvé positif après l'application des méthodes de bactériologie classique (méthodes de référence et/ou méthode FIL) ou des méthodes alternatives validées AFNOR (ELISA et VIDAS).

Parmi les 60 échantillons testés en relation avec l'investigation, 27 d'entre eux ont été trouvés négatifs à la fois par les méthodes de bactériologie classique, les méthodes alternatives de type ELISA et les méthodes de PCR que ce soit par PCR ELISA et/ou PCR-TR.

Trente deux échantillons ont montré un signal positif par PCR (PCR-ELISA et/ou PCR TR), parmi ceux ci 4 avaient été retrouvés positifs par la méthode FIL modifiée appliquée au laboratoire de la Dgcrf de Rennes. Cet écart important de positivité entre les résultats par PCR et les résultats par méthodes conventionnelles peut être la conséquence d'une part de la différence de sensibilité entre les deux méthodologies, la PCR étant généralement plus sensible que les méthodes conventionnelles, puisqu'elle permet de détecter en théorie après amplification une seule bactérie présente dans la prise d'essai. Le plus grand nombre de positifs par PCR peut être d'autre part attribuable à une différence de cible analytique, la PCR ciblant, outre les bactéries vivantes en état de se développer sur des milieux de culture, les bactéries mortes ou stressées ou viables non cultivables.. De plus, il est à remarquer que l'ensemble des analyses PCR ont été réalisées en double voire en triple ou quadruple pour un même échantillon et que les résultats de chacune des PCR pouvaient être discordants entre eux. Ceci peut s'expliquer par le nombre de cellules présentes dans l'échantillon qui n'a pas toujours atteint le seuil minimal de détection de la méthode. Enfin, les résultats d'analyse par PCR ont fréquemment montré la présence d'inhibiteurs dans le milieu réactionnel rendant ainsi l'analyse non interprétable. Des dilutions de l'échantillon ont parfois permis de lever ces inhibitions mais tout en diminuant le seuil de sensibilité de la méthode. Un seul échantillon a été trouvé positif par la méthode FIL modifiée réalisée au laboratoire de la Dgcrf de Rennes et négatif par les deux méthodes PCR ; il s'agit probablement d'une discordance liée à l'hétérogénéité de contamination de l'échantillon puisque ces deux analyses ont été réalisées séparément dans le temps et sur deux prises d'essais différentes.

Tableau 3 : Synthèse des résultats d'analyse des échantillons reliés à l'investigation

Bactério-ELISA \ PCR	+	-	Total
+	4 (FIL modifiée)	1 (FIL modifiée)	5
-	28	27	55
Total	32	28	60

Analyses des résultats des échantillons « témoins » (Annexe II)

Les 6 échantillons témoins ont été prélevés à partir de boîtes de lait en poudre de marque différente achetées dans une grande surface de la région parisienne. Les résultats d'analyse détaillés figurent dans l'annexe II et montrent clairement que 5 des 6 échantillons analysés ont été retrouvés positifs par PCR TR et négatifs par les méthodes bactériologiques conventionnelles ou alternatives.

Les analyses par PCR-TR ont été doublées et les même résultats de positivité sont apparus avec dans certains cas la présence d'inhibition rendant le résultat non interprétable. Enfin un échantillon a bien été retrouvé négatif par les méthodes bactériologiques et par la méthode PCR-TR.

III.4 Conclusions

Cette étude montre bien qu'il est difficile d'établir une comparaison entre d'une part, les méthodes bactériologiques conventionnelles et alternatives et d'autre part, les méthodes utilisant la PCR, compte tenu des différences de sensibilité et de cibles détectées par les méthodes.

Les critères microbiologiques aujourd'hui fixés s'appliquent sur des résultats obtenus par les méthodes bactériologiques conventionnelles ou alternatives validées. Les méthodes de type PCR peuvent être un indicateur intéressant de la présence de cellules viables mais aussi mortes ou stressées dans certains cas. Les étapes d'enrichissement appliquées à l'échantillon avant la réalisation de la PCR visent justement à détecter les bactéries viables et capables de se multiplier, néanmoins la présence de cellules mortes ou stressées en grand nombre (10^3 - 10^4 /ml) peut également donner un résultat positif en PCR et être considéré comme un indicateur de contamination excessive de salmonelles dans la matière première avant transformation ou traitement thermique même si les cellules sont mortes ou non cultivables dans l'échantillon analysé. Il est à remarquer que la méthode FIL modifiée a été la seule à pouvoir détecter épisodiquement des salmonelles dans les échantillons mais que cette positivité n'a pu être révélée qu'après l'analyse de tout le contenu des boites de poudre de lait par prise d'essai de 25 grammes représentant ainsi un volume énorme d'analyses et révélateur d'une contamination très faible et hétérogène en salmonelle.

Enfin, il serait intéressant de compléter cette étude, pour approfondir la comparaison entre méthodes conventionnelles et PCR, en effectuant une PCR "directe" (prise d'essai dans bouillon d'enrichissement, sans phase d'enrichissement), qui pourrait permettre de savoir si les résultats PCR positifs étaient dûs à un fort niveau de cellules mortes (PCR directe positive) ou à un faible niveau de cellules vivantes (PCR directe négative) non retrouvées par méthode conventionnelle.

ANNEXE I

Principe et Protocoles de détection par PCR-ELISA et/ou PCR en temps réel de salmonelles appliqués aux poudres de lait infantiles dans le cadre de l'investigation

1) Mise en culture : Enrichissement

Vingt cinq grammes de poudre de lait sont prélevés de chaque échantillon de lait infantile analysé et mis en culture dans 225ml d'eau peptonée. Après homogénéisation par agitation, l'échantillon est placé pendant dix-huit heures dans une étuve bactériologique à 37°C.

2) Extraction des séquences nucléiques

Deux fois 1 ml de culture sont prélevés stérilement et centrifugés à 13000 RPM pendant 15 minutes à 4°C. L'ADN contenu dans le culot cellulaire est extrait et purifié avec le kit DNeasy tissue (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fournisseur. L'ADN de chaque échantillon est élué avec 50µl d'H₂O.

3) Amplifications et détection spécifique des produits d'amplification

3. 1. Systèmes moléculaires utilisés

Les systèmes moléculaires utilisés amplifient des fragments de petite taille (285pb), tant pour améliorer l'efficacité des PCR que pour tenir compte d'une fragmentation possible de l'ADN et ainsi d'avoir une grande sensibilité.

Afin de valider le résultat PCR obtenu avec lors de l'amplification de la séquence du gène *invA* spécifique des salmonelles (numéro d'accèsion genbank : M90846; Perelle et al. 2004), il est nécessaire de réaliser toutes les amplifications en ajoutant une quantité limite et connue de plasmide portant la même séquence que la cible à l'exception de 26 nucléotides. Cette séquence interne correspond à la zone de fixation d'une sonde spécifique permettant de distinguer l'amplification d'ADN de salmonelles de celle due à l'amplification de cette séquence et ainsi de déterminer si un échantillon contient des inhibiteurs PCR (Perelle et al. 2004). Cette séquence est appelée contrôle interne.

3. 2. Méthodes de détection des produits d'amplification

Les deux méthodes de détection des produits d'amplification mises en œuvre dans cette alerte font appel à des hybridations avec des sondes internes spécifiques des fragments amplifiés. Ces deux techniques ont été choisies car elles présentent deux avantages importants : sensibilité et

spécificité. La différence majeure entre ces 2 techniques est que la détection en PCR-ELISA a lieu après l'amplification alors que la détection par PCR en temps réel (PCR-TR) est réalisée au fur et à mesure des cycles d'amplification.

-Principe de la PCR-ELISA

Après amplification par PCR de la séquence cible avec des amorces spécifiques, la présence d'amplicon est détectée par hybridation en solution, à l'aide de deux sondes internes marquées respectivement par la biotine et la digoxigénine. Cette hybridation est réalisée en plaques 96 puits recouverts par de la streptavidine qui permet de fixer le complexe : fragment amplifié et sondes internes. La révélation de la fixation de ce complexe dans les puits est réalisée en utilisant un anticorps dirigé contre la digoxigénine et couplé à une enzyme (péroxydase) dont l'activité est mise en évidence à l'aide d'un substrat chromogène.

-Principe de la PCR-TR utilisant des sondes d'hybridation

La PCR-TR réalisée avec des sondes d'hybridation est utilisée pour la détection spécifique et la quantification de séquences cibles d'ADN dans un échantillon. Cette technologie est basée sur la mesure de la fluorescence émise par l'hybridation de deux sondes internes au fragment amplifié. Ces sondes internes sont des oligonucléotides portant respectivement un marquage avec un fluorophore en 3' (fluorescéine) et en 5' (Red640 ou Red705).

A chaque cycle PCR, l'ADN cible est dénaturé et séparé en 2 brins. La deuxième étape de la PCR consiste en l'hybridation des amorces et des sondes internes sur l'ADN cible puis à la duplication de chaque brin d'ADN par la Taq DNA polymerase.

Dans le milieu réactionnel lors des étapes de dénaturation et d'élongation, les deux sondes internes sont spatialement éloignées. Dans ces conditions, la fluorescéine portée par l'une des sondes, est excitée par le laser de l'appareil PCR et émet une lumière verte à 530nm.

Lorsque les 2 sondes internes s'hybrident sur l'ADN, lors de l'étape d'hybridation, les 2 fluorophores (fluorescéine/Red640 ou fluorescéine/Red705) se trouvent très proches l'un de l'autre. Dans ces conditions, la fluorescence émise par la fluorescéine va exciter le 2^{ème} fluorophore (Red640 ou Red705) qui va alors émettre une fluorescence rouge à 640 ou 705nm. Ce transfert d'énergie est directement relié à la distance séparant les 2 marqueurs. La fluorescence rouge émise à la fin de l'étape d'hybridation de chaque cycle est mesurée dans des canaux indépendants, ce qui permet de distinguer l'amplification de la séquence cible de celle du contrôle interne.

Protocole PCR ELISA

Les amplifications en point final pour la PCR-ELISA ont été réalisées à l'aide d'un thermocycler GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) dans un volume final de 100µl contenant : 1X de tampon FastStart DNA polymerase (Roche Diagnostics, Meylan, France),

0.1mM de dNTP (Roche Diagnostics), 2mM de MgCl₂, 0.8μM de chacune des amorces P139 et P141N (Proligo, Paris, France), 25 copies du plasmide T69 portant la séquence du contrôle interne et 2.5 unités de la taq DNA polymérase FastStart (Roche Diagnostics). Cinq microlitres d'extrait d'ADN pur et dilué au 2/5 ont été testés.

Les conditions d'amplification ont été de 3min à 94°C, puis 40 cycles de 30s à 95°C, 30s à 62°C et 30s à 72°C, suivi par 7min d'élongation finale à 72°C.

La détection par PCR-ELISA des produits d'amplification a été réalisée selon le protocole décrit par Fach et al. 2001. Les produits d'amplification ont été dénaturés à la chaleur (95°C pendant 10 minutes) puis par l'ajout d'un volume de solution dénaturante (NaOH 0,2 M, EDTA 0,05 M, bleu de bromophénol 0,07 %). L'hybridation a été réalisée sur une plaque 96 puits dont chacun d'eux est recouvert par de la streptavidine (Kit PCR-ELISA, Roche Diagnostics). Deux cents microlitres de solution d'hybridation (Kit PCR-ELISA, Roche Diagnostics) contenant 12 picomoles par millilitre de chacune des sondes (S143dig, S144biot et S150biot; Proligo, Paris, France) sont répartis par puits. Cinquante microlitres de produit d'amplification préalablement dénaturé sont ajoutés avant d'être incubé à 37°C pendant 1 heure sous agitation (420 RPM). Après cette étape d'hybridation, chaque puits est rincé 6 fois par 400μl de solution de lavage n° 2 (tris-HCl 0,1M; NaCl 0,15M; tween 20 0,5g/l; blocking reagent 0,5 % et DNA fish sperm 100mg/l). Chaque puits de la plaque 96 puits est ensuite incubé avec 200μl de la solution d'anticorps conjugué anti-Digoxigénine marqué à la peroxydase. Après une incubation à 37°C pendant 30 minutes avec une agitation à 420RPM, la plaque est lavée comme précédemment décrit. La révélation est effectuée en ajoutant 200μl de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine à chaque puits et en incubant sous agitation à 420RPM pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée en additionnant 100μl de H₂SO₄ 1,5N. L'intensité de la réaction colorimétrique obtenue est lue à l'aide du lecteur de micro plaque à 450/620 nm.

Protocole PCR temps réel

Tous les extraits d'ADN ont été amplifiés en PCR temps réel avec des sondes d'hybridation sur LightCycler™ (Roche Diagnostics) dans un volume final de 20μl contenant : 1X de tampon LightCycler FastStart DNA master hybridation probes (Roche Diagnostics) , 4.5mM de MgCl₂, 0.5μM de chacune des amorces P139 et P141N (Proligo), 0.2μM de chacune des sondes (LC143deg, LC144deg et LC150new ; Proligo) et 128 copies du plasmide T69. Toutes les réactions d'amplification ont été réalisées avec 5μl d'extrait pur ou dilué au 2/5, 4/25, 3/50, 1/50 et au 1/100.

Les conditions d'amplification appliquées sont composés d'une étape d'activation de la Taq DNA polymérase de 10 min à 95°C, suivi par 45 cycles de 10s à 95°C, 5s à 48°C, 10s à 60°C et 15s à 72°C. Afin de suivre l'amplification de la cible au cours des cycles, une lecture de la fluorescence

émise par l'hybridation des sondes sur l'ADN est réalisée à la fin de chaque étape d'hybridation à 48°C.

4) Interprétation des résultats

Pour les 2 méthodes de détection utilisées, l'interprétation des résultats est similaire. En effet, tous les échantillons sont analysés en utilisant un volume maximum d'extrait (5µl). Après amplification et détection de la séquence cible spécifique des salmonelles ainsi que du contrôle interne, les résultats sont comparés. Tous les échantillons présentant une amplification de la cible salmonelle sont des échantillons positifs (exemple échantillon 1, Figure 1). Dans le cas où un échantillon ne présente pas d'amplification de la séquence spécifique des salmonelles mais une amplification du contrôle interne, alors cet échantillon est négatif (exemple échantillon 2, Figure 1). Pour finir, un extrait d'ADN pour lequel aucune des 2 cibles n'est amplifiée indique que cet extrait d'ADN contient des inhibiteurs PCR (exemple échantillon 3, Figure 1). Dans ces conditions, il est impossible de donner un résultat. Afin de donner un résultat pour ces échantillons, les extraits sont dilués et retestés jusqu'à ce qu'il soit possible de conclure si cet extrait est positif ou négatif. Dans le cadre de cette étude, les dilutions successives appliquées aux échantillons ont été assez faibles afin de pouvoir détecter des échantillons contenant une faible quantité des séquences d'ADN spécifiques des salmonelles mais présentant une inhibition lors des 1^{ères} amplifications.

Références Bibliographiques liées à cette méthodologie :

Perelle S, Dilasser F, Malorny B, Grout J, Hoorfar J, Fach P. (2004) Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Mol. Cell. Probes* 18, 409-20

Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F. and Grout, J. (2001) Comparison between a PCR-ELISA test and the Vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *J. Appl. Microbiol.* 90, 809-818

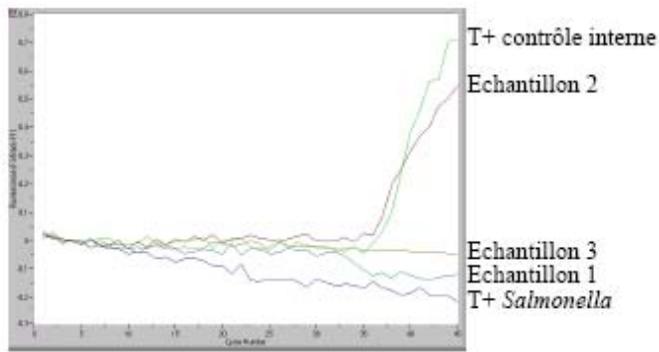
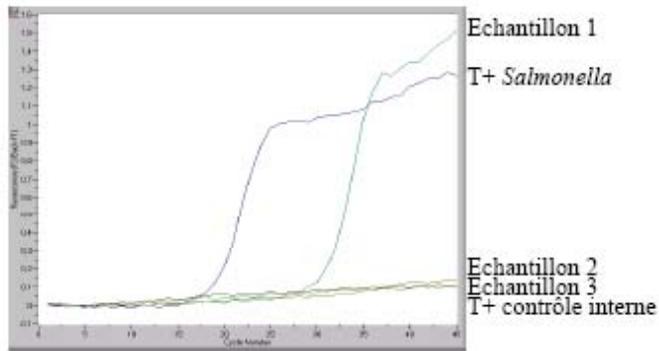


Figure 1 : Exemples de résultats

ANNEXE II

Résultats des analyses

réf AFSSA (05HMPL...)	n°	Lot -Origine	Résultats							
			DGCCRF	AFSSA					PCR-TR	
				Ref	FIL modifiée	VIDAS ICS	VIDAS SLM	ELISA		PCR-ELISA
35	Témoin : lait Guigoz	4352080623			-	-	-	-		- (5µl) / - (0.8µl)
41	Blédilait 2 réf 05-1811		-				-	-	+ (5µl)	
42	Blédilait 2 réf 05-1812		-				-	-	+ (5µl)	
47	59 5 2005 135	289DNH	Lots retirés du commerce et + lors 1 ^{er} essai	-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (0.8µl) / - (0.3µl)
48	59 5 2005 136	289DNH		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (2µl) / - (2µl)
49	59 5 2005 137	290DNH		-				-	I (2µl) / I (2µl)	+ (5µl) / + (0.3µl)
50	59 5 2005 138	290LD008		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (5µl) / + (5µl)
51	59 5 2005 139	875DNL	Avant nettoyage usine	-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (0.8µl) / - (0.1µl)
52	59 5 2005 140	79DNL		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (5µl) / - (0.8µl)
53	59 5 2005 141	876DNT		-				-	+ (5µl) / I (2µl)	- (5µl) / - (0.1µl)
54	59 5 2005 142	560DNE		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (5µl) / + (5µl)
55	59 5 2005 143	933BLK		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (5µl) / + (0.8µl)
56	59 5 2005 144	561DNE		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (5µl) / + (5µl)
57	59 5 2005 145	130DNE		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (5µl) / + (0.8µl)
58	59 5 2005 146	31DNJ	Avant nettoyage usine	-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (5µl) / + (0.8µl)
59	59 5 2005 147	74DNZ		-				-	+ (5µl) / + (2µl)	+ (0.8µl) / - (0.1µl)
60	59 5 2005 148	75DNZ		-				-	- (5µl) / - (5µl)	- (0.3µl) / - (0.1µl)
61	59 5 2005 149	443DNP		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	- (0.3µl) / - (0.3µl)
62	59 5 2005 150	937DNU	Après nettoyage usine	-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (2µl) / - (0.3µl)
63	59 5 2005 151	128BLY		-				-	+ (5µl) / + (5µl)	+ (5µl) / + (0.8µl)
64	59 5 2005 152	943DUJ		-				-	+ (5µl) / - (2µl)	- (5µl) / - (0.1µl)

65	59 5 2005 153	262BD5	Lots d'autres origines		-				-	+ (5µl) / - (2µl)	- (0.3µl) / - (0.1µl)
66	59 5 2005 154	262BD5			-				-	- (5µl) / - (5µl)	- (5µl) / - (0.3µl)
67	L35 05-1987	121BDE		-	-			-	-		- (2µl) / - (0.3µl)
68	L35 05-1988	1231BL9		-	-			-	-		+ (5µl) / + (5µl)
69	L35 05-1990	1221BLX		-	-			-	-		+ (5µl) / + (2µl)
70	L35 05-1994	1229BL7		-	-			-	-		- (5µl) / - (5µl)
71	L35 05-1995	1229BL7		+	-			-	-		+ (2µl) / + (0.8µl)
72	L35 05-2157	1221BLX		-	-			-	-		+ (5µl) / + (0.8µl)
73	L35 05-2168	1231BL9		-	-			-	-		+ (5µl) / + (5µl)
74	L35 05-2169	1211BLK		-	-			-	-		+ (2µl) / - (5µl)
75	L35 05-2178	1231BL9		-	-			-	-		+ (5µl) / + (5µl)
76	DDASS 41	289DNH			-			-	-		+ (5µl) / + (2µl)
77	L35 05-2350	1229BL7		+	-			-	-		1ère culture : + (5µl) / + (5µl) 2ème culture : + (0.8µl) / - (0.05µl)
78	L35 05-2351	1229BL7		+	-			-	-		+ (0.8µl) / - (0.1µl)
79	L35 05-2346	1229BL7		+	-			-	-		- (0.1µl) / - (0.1µl)
80	L35 05-2345	290DNH		+	-			-	-		+ (5µl) / - (0.05µl)
81	Témoin AFSSA 5 Nutricia	41218940004924			-			-	-		1ère culture : + (5µl) / - (5µl) 2ème culture : - (0.3µl) / - (0.05µl)
82	Témoin AFSSA 4 Guigoz	5047080623			-			-	-		1ère culture : + (5µl) / + (5µl) 2ème culture : - (0.1µl) / - (0.05µl)
83	Témoin AFSSA 3 Nidal	ESEF D			-			-	-		1ère culture : + (5µl) / + (5µl) 2ème culture : + (0.8µl) / - (2µl)
84	Témoin AFSSA 2 Milumiel	BAN POZ			-			-	-		1ère culture : + (2µl) / - (2µl) 2ème culture : - (0.1µl) / - (0.05µl)
85	Témoin AFSSA 1 Modilac	06171/1001 T DLU			-			-	-		+ (0.8µl) / + (0.3µl)
86	Blédilait	1299BL7-210758001434			-	-		-	-		- (0.3µl) / - (0.3µl)

105	Fond de tremie SA263	FB17		-		-	-	-		- (0.3µl) / - (0.3µl)
106	Poudre prélevée sur vis SA264	FB18		-		-	-	-		+ (5µl) / - (2µl)
107	Poudre sur godets SA265	FB19		-		-	-	-		- (0.3µl) / - (0.3µl)
108	Poudre prélevée sur vis SA266	FB20		-		-	-	-		- (0.8µl) / - (0.3µl)
109	Poudre prélevée sur dessus cheminée SA267	FB21		-		-	-	-		- (0.8µl) / - (0.3µl)
110	Poudre prélevée sur entonnoir SA268	FB22		-		-	-	-		- (0.8µl) / - (0.3µl)
111	Blédilait 2			-		-	-	-		- (0.8µl) / - (0.3µl)
Echantillon Vincent				-		-	-	-		+ (0.8µl) / - (0.8µl)
Eau peptonée				-		-	-	-		- (2µl) / - (2µl)

Volumes indiqués entre parenthèses correspondent aux volumes maximum pour lequel il a été possible de donner un résultat

+/+ : les 2 prélèvements donnent un signal PCR positif

+/- : un des 2 prélèvements donne un signal PCR positif et l'autre un signal négatif

-/- : les 2 prélèvements donnent un signal PCR négatif

+/I : un des 2 prélèvements donne un signal PCR positif et l'autre est inhibé

-/I : un des 2 prélèvements donne un signal PCR négatif et l'autre est inhibé

I/I : les 2 prélèvements sont inhibés

Annexe 5 : mesures de contrôle et communiqués de presse



Ministère des petites et moyennes Entreprises, du Commerce, de l'Artisanat, des Professions Libérales et de la Consommation

Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes

Ministère des Solidarités, de la Santé et de la Famille

Direction Générale de la Santé

Paris, le 4 mars 2005

Communiqué de presse

Retrait de lait infantile en raison d'infections à *Salmonella agona*

Le Centre national de référence des Salmonelles (Institut Pasteur, Paris) a identifié, en janvier et février 2005, un nombre inhabituel de souches de *Salmonella* sérotype *agona* isolées chez de jeunes enfants (âgés de 1 mois à 2 ans). Une investigation épidémiologique est actuellement menée par l'Institut de veille sanitaire. Les premiers éléments de cette investigation montrent que les 19 enfants dont les familles ont été interrogées à ce jour ont tous consommé des laits produits par le même fabricant. Il s'agit des laits infantiles de la marque Picot. Les 19 enfants concernés (nourrissons âgés de 1 à 6 mois), dont certains ont été hospitalisés, sont guéris.

En conséquence, la firme, en lien avec la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes et la Direction générale de la Santé, a retiré tous les laits de la marque Picot de la commercialisation. Les familles qui disposent de boîtes de cette marque ne doivent pas les utiliser.

La Direction générale de la santé rappelle à cette occasion les principes d'hygiène qu'il faut respecter lors de la préparation des biberons :

- Chaque manipulation doit être précédée d'un lavage soigneux des mains à l'eau et au savon
- Les biberons ne doivent pas être préparés à l'avance
- Les biberons doivent être nettoyés aussitôt après usage.

Les infections à *Salmonella agona* surviennent dans les 3 jours suivant l'ingestion, et provoquent un tableau de gastro-entérite avec des vomissements, une diarrhée parfois sanglante, et fébrile dans la majorité des cas. L'apparition de ces signes chez un nourrisson doit conduire les familles à consulter un médecin.

Contacts presse

DGS 01 40 56 54 91
DGCCRF 01 44 97 23 91
InVS 01 41 79 67 15



EUROPEAN COMMISSION
HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL

Directorate D - Food Safety: production and distribution chain
D5 - Relations with the European Food Safety Authority; Rapid Alert System



Brussels, 14 March, 2005



FOOD
VERY URGENT - TRES URGENT

ALERT NOTIFICATION: 2005.159
ORIGINAL NOTIFICATION

SUBJECT: SALMONELLA AGONA IN INFANT FORMULAE AND FOLLOW-ON FORMULAE FROM FRANCE

PAGES: COVER PAGE (1) + 4

FAXNUMBER: +32-2-296 76 74
EMAIL: sanco-rasff@cec.eu.int
HTTP://FORUM.EUROPA.EU.INT/

market control - distribution on the market (possible) -
Product distributed to FRANCE and ITALY
manufacturer: Société Celia (FRANCE)

The contact point from FRANCE is kindly requested to provide the measures taken

The contact point from FRANCE has communicated to the Commission the following information:

RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED

REGULATION (EC) N°: 178/2002 – Art. 50

GENERAL INFORMATION:

1	NOTIFICATION TYPE:	food
2	CONTROL TYPE:	consumer complaint
3	NOTIFYING COUNTRY:	France
	Contact point reference n°:	
4	DATE OF NOTIFICATION:	11/03/2005

HAZARD:

5	NATURE OF HAZARD:	Salmonella Agona
6	RESULTS OF THE TESTS:	
7*	COUNTER ANALYSIS:	
8*	SAMPLING	DATES:
		N° OF SAMPLES:
		METHOD
		PLACE:
9*	LABORATORY:	
10*	ANALYSIS:	SAMPLE TREATMENT/ ANALYSIS MATRIX:
		METHOD OF ANALYSIS:
11*	PERSONS AFFECTED:	22 cas
12*	TYPE OF THE ILLNESS/SYMPTOMS:	gastro-entérites chez les nourissons

PRODUCT:

13	PRODUCT CATEGORY:	LAIT POUR ENFANTS
14	PRODUCT NAME:	- LAIT PREMIER AGE (0-6 MOIS) - LAIT 2 ^{EME} AGE (6-12 MOIS) - LAIT ANTIREGURGITATION - LAIT HYPOALLERGENIQUE
15*	DESCRIPTION OF THE PRODUCT	BRAND / TRADE NAME: PICOT
	<input type="checkbox"/> Picture(s)	PRODUCT ASPECT (e.g. packaging):
		UNIT WEIGHT:

OUTCOME OF INVESTIGATION AND MEASURES ADOPTED:

16	DISTRIBUTION STATUS:	distribution on the market (possible) ▼
17*	VOLUNTARY MEASURES:	
18*	COMPULSORY MEASURES:	
	DATE OF ENTRY INTO FORCE:	
	DURATION:	
	<input type="checkbox"/> PUBLIC RECALL:	(hyperlink)
19	LEGISLATION IN BREACH:	
	SCOPE:	▼
	MAX. PERMITTED LEVEL:	

IDENTIFICATION OF THE LOT(S)

20*	CONSIGNMENT / LOT NUMBER:	- Lait Premier Age : désignation Bambilat 1 ^{er} âge. Lots : 310713 DNN 86435 et 310712 86435 - Lait 2 ^{ème} âge : désignation Bambilat 2 ^{ème} âge. Lots : 37012 DNN 86435 et 310715 DNN 86435 - Lait antirégurgitation : désignation Bambilat 1 ^{er} âge. Lot 37017 DN 586435 - Lait hypoallergénique : désignation Bambilat HA. Lot 37018 DFX 83648
21*	PUBLIC HEALTH CERTIFICATE	NUMBER:
		DATE:
		CVED N°:
22	DURABILITY DATES	USE-BY DATE*:
		BEST BEFORE DATE*:
		SELL-BY DATE:
23	DESCRIPTION OF THE LOT:	N° OF UNITS*: - Lait Premier Age : cartons de 12 boîtes de 450 g et cartons de 6 boîtes de 900 g. - Lait 2 ^{ème} âge : cartons de 12 boîtes de 450 g et cartons de 6 boîtes de 900g. - Lait antirégurgitation : cartons de 12 boîtes de 400 g. - Lait hypoallergénique : cartons de 12 boîtes de 400 g.
		TOTAL NET WEIGHT OF LOT*:

ORIGIN:

24	COUNTRY OF ORIGIN:	France
25	MANUFACTURER:	Société Celia
	NAME:	

26*	ADDRESS:	La Chaussée aux Moines BP 12 53400 CRAON tél. 02.43.70.71.72
	VET. AP-N°:	
	DISPATCHER/ EXPORTER	NAME: ADDRESS:

DISTRIBUTION:

27*	DISTRIBUTED BY	IMPORTER:	
		WHOLESALER:	
		RETAILER:	
28*	DISTRIBUTION TO MEMBER STATES:	Italie Distributeur : Société FARMA 1000 société : Via Camperio 9 20123 MILANO entrepôt : Via d'Arezzo 4 20145 MILANO	
	DISTRIBUTION LIST ATTACHED:	<input type="checkbox"/>	
29*	EXPORTED TO THIRD COUNTRIES:		
	DISTRIBUTION LIST ATTACHED:	<input type="checkbox"/>	

IN CASE OF A REJECTION AT THE BORDER:

30*	POINT OF ENTRY:	
31*	TYPE OF CHECK	<input type="text"/>
32*	COUNTRY OF DISPATCH	
33*	COUNTRY OF DESTINATION	
34*	CONSIGNEE	NAME:
		ADDRESS:
35*	CONTAINER NUMBER(S):	
36*	MEANS OF TRANSPORT:	

OTHER INFORMATION:

37	ORGANISATION/MINISTRY:	
38*	PERSON TO CONTACT:	
39	OTHER INFORMATION:	En Italie, le produit est vendu sous la marque BAMBILAT. La société FARMA 1000 est le seul client de CELIA France pour l'Italie.

41*	ATTACHED DOCUMENTS: (compressed format)	<input type="checkbox"/> health certificate <input type="checkbox"/> CVED <input type="checkbox"/> phytosanitary certificate <input type="checkbox"/> analytical report <input type="checkbox"/> bill(s)/delivery document(s) <input type="checkbox"/> press release/public recall info other:
42*	CONFIDENTIAL:	<input type="checkbox"/>
43*	IF YES, WHICH BOXES (NUMBERS):	
44*	IF YES, REASON:	

numbers underlined: information is required
 numbers with *: information is required, if applicable

Blédina procède à un rappel de certains lots de lait pour enfant.

Villefranche-sur-Saône, le 7 avril 2005. En accord avec les autorités de sécurité sanitaire, Blédina procède à un rappel de certains lots de lait infantile 2° âge en poudre.

Cette décision fait suite au signalement, par les autorités de santé, de deux cas de gastro-entérites à *Salmonella* chez des enfants en bas-âge ayant consommé du lait Blédilait 2^{ème} âge. Les enfants concernés sont en bonne santé.

En conséquence, Blédina a décidé de retirer du marché les laits 2° âge en poudre portant les dénominations et références suivantes (imprimées sous la boîte) :

○ Gallia 2	450g	DEC 06Lot : 1210 / BLJ
○ Gallia 2	900g	DEC 06Lot : 1211 / BLK
○ Blédilait 2	450g	DEC 06Lot: 1210 / BLJ
○ Blédilait 2	900g	DEC 06Lot: 1221 / BLX
○ Blédilait 2	450g et 900g	DEC 06Lot: 1229 / BL7
○ Blédilait 2	900g	DEC 06Lot: 1231 / BL9

Le rappel de ces lots ne concerne que le marché français.

Il est demandé aux familles de ne pas utiliser les laits ci-dessus.

Les consommateurs qui auraient acheté ces produits sont invités à contacter le N° Vert mis en place spécifiquement par Blédina : **0800 860 800**. Ils y trouveront des informations pratiques et les modalités de remboursement mises en place par Blédina.

Les autres lots de lait des marques Blédilait et Gallia tout comme l'ensemble des autres produits de la gamme Blédina ne sont pas concernés par cette mesure.

Ce type d'infection survient dans les 3 jours suivant l'ingestion, et provoque les symptômes classiques de la gastro-entérite : vomissements, diarrhée et fièvre. L'apparition de ces signes chez un enfant ayant consommé dans les trois jours précédents les laits Gallia 2 et Blédilait 2 ci-dessus doit conduire les familles à consulter un médecin.

Il est utile de rappeler à cette occasion les principes d'hygiène à respecter lors de la préparation des biberons :

- Chaque manipulation doit être précédée d'un lavage soigneux des mains à l'eau et au savon
- Les biberons ne doivent pas être préparés à l'avance
- Les biberons doivent être nettoyés aussitôt après usage.

Cette procédure s'applique également à l'ensemble des distributeurs auxquels il est demandé de retirer ces mêmes lots de leurs linéaires.

Pour plus d'information, service de presse Blédina : 01 41 86 76 50 / 01 41 86 77 68

Burson-Marsteller pour Blédina



EUROPEAN COMMISSION
HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL

Directorate D - Food Safety: production and distribution chain
D5 - Relations with the European Food Safety Authority; Rapid Alert System



Brussels, 10 May, 2005



FOOD
VERY URGENT - TRES URGENT

ALERT NOTIFICATION: 2005.159-add06
ADDITIONAL INFORMATION

SUBJECT: SALMONELLA AGONA IN INFANT FORMULAE AND FOLLOW-ON FORMULAE FROM FRANCE

PAGES: COVER PAGE (1) + 3

FAXNUMBER: +32-2-296 76 74
EMAIL: sanco-rasff@cec.eu.int
HTTP://FORUM.EUROPA.EU.INT/

outcome of investigations and measures taken in FRANCE
Distribution to Italy - Product voluntary withdrawn

The contact point from FRANCE has communicated to the Commission the following information:

Blédina rappelle trois lots de lait en poudre

La société Blédina, filiale du groupe Danone, a annoncé, hier, qu'elle procédait à « un rappel complémentaire » de trois lots de lait en poudre pour bébés. Cette décision a été prise après l'apparition de cas de gastro-entérites à Salmonelle chez des jeunes enfants ayant consommé du lait Blédilait 2^e âge. Les lots concernés sont le Gallia 2 (lot 289/DNH), le Blédilait 2 (LOT 289/DNH) et le Blédilait 2 (lot 290/DNH). Blédina a mis en place un numéro Vert (0800 860 800) pour les consommateurs qui auraient acheté ces produits.