

Appui scientifique et technique pour apprécier les performances des méthodes alternatives utilisées dans le cadre d'autocontrôles pour le dosage de l'histamine

Demande « 2025-AST-0036 »

Saisine liée « 2021-SA-0021 - Avis du 20 juin 2022 relatif à la représentativité de l'échantillonnage pour la recherche d'histamine dans les poissons »

RAPPORT
d'appui scientifique et technique*

Expertise
du « LNR Histamine »

Avril 2026

* Ce rapport annule et remplace le rapport de janvier 2026. Les modifications sont tracées en annexe 4.

Citation suggérée

Anses. (2025). Appui scientifique et technique pour apprécier les performances des méthodes alternatives utilisées dans le cadre d'autocontrôles pour le dosage de l'histamine. (Saisine 2025-AST-0036). Maisons-Alfort : Anses, 30 p.

Mots clés

Histamine, poisson, intoxication par le poisson, critères microbiologiques, méthode de référence, amines biogènes, CLHP, immunochromatographie, ELISA, EIA, sensibilité, spécificité.

Histamine, fish, fish poisoning, microbiological criteria, reference method, biogenic amines, HPLC, immunochromatography, ELISA, EIA, sensitivity, specificity.

Présentation des intervenants

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Guillaume DUFLOS – Responsable du LNR Histamine dans les produits de la pêche et de l'aquaculture – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments (LSAI), site de Boulogne sur mer

Contribution scientifique

Mme Sophie KRYS – Responsable Adjointe du LNR Histamine dans les produits de la pêche et de l'aquaculture – Anses, LSAI, site de Boulogne sur mer

M. Laurent GUILLIER – Direction de l'Evaluation des risques, Unité d'Evaluation des risques liés aux aliments – Anses, Maisons-Alfort

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations.....	5
Liste des tableaux	5
Liste des figures.....	5
1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux	6
1.1 Contexte	6
1.2 Objet de la demande	6
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	7
2 Question 1 : « Réaliser un parangonnage des différents tests sur la base de l'étude des dossiers de performances disponibles avec appréciation de leur performance »	8
2.1 Référentiel AOAC utilisés pour la certification des méthodes alternatives pour le dosage de l'histamine dans le poisson et les produits de la pêche.....	8
2.1.1 Annexe F.....	8
2.1.2 Annexe M.....	9
2.2 Analyse des différents types de méthodes alternatives.....	9
2.2.1 Méthodes basées sur le principe immunochromatographique à flux latéral	9
2.2.2 Méthodes basées sur le principe de dosage enzymatique	10
2.2.3 Méthodes basées sur le principe de dosage enzymatique via l'utilisation de biocapteur	10
2.2.4 Méthodes basées sur le principe de dosage ELISA	10
3 Question 2 : « Indiquer dans quel cadre (à partir de quelle teneur lors d'un autocontrôle) et selon quelles modalités (nouvel échantillonnage ou même broyat que celui analysé) une analyse de confirmation avec la méthode NF EN ISO 19343 devrait être réalisée. »	15
4 Question 3 : Préciser si des lignes directrices sont disponibles concernant la préparation de l'échantillon analytique (ex. taille minimale de l'homogénat en fonction de la taille du lot, autre...), et permettant de maintenir un niveau de représentativité minimum.	16
5 Question 4 : Lorsque des regroupements d'échantillons intra-lot sont réalisés par les opérateurs dans le cadre d'autocontrôles recourant au test ELISA quantitatif, indiquer les règles à respecter pour que le résultat soit interprétable, le cas échéant.	18
5.1 Non-équivalence entre échantillons regroupés (pooling) et plan d'échantillonnage classique	18
5.2 Absence de justification scientifique pour l'utilisation du même seuil m/M sur un pool 19	
6 Conclusion générale.....	20
7 Bibliographie.....	21

Annexe 1 : Lettre de la demande.....	23
Annexe 2 : AOAC Official Method 937.07	26
Annexe 3 : Scripts R utilisés pour les analyses (sections 5.1 et 5.2)	27
Annexe 4 : Suivi des actualisations du rapport	30

Sigles et abréviations

AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
CES	: Comité d'experts spécialisé
CLHP	: Chromatographie Liquide Haute performance
EIA	: Enzyme Immuno Assay
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
NMKL	: Nordic-Baltic Committee on Food Analysis
UV	: Ultra-Violet

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des différentes méthodes immunochromatographiques.....	11
Tableau 2 : Comparaison des différentes méthodes basées sur le principe de dosage enzymatique colorimétrique.....	12
Tableau 3 : Comparaison des différentes méthodes basées sur le principe de dosage enzymatique via des bio-capteurs	13
Tableau 4 : Comparaison des différentes méthodes basées sur le principe de l'ELISA	14
Tableau 5 : Probabilités d'acceptation d'un lot en fonction de scénarios de contamination intra-lot en histamine	18

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des différents niveaux de représentativité.....	16
---	----

1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux

1.1 Contexte

Le règlement (CE) n°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires demande le contrôle du taux en histamine dans certains produits de la pêche par une méthode d'analyse prise en référence. Ce règlement a été actualisé par le règlement (UE) 2019/229 qui précise notamment que la norme européenne et internationale EN ISO 19343¹ doit être appliquée en tant que méthode de référence pour la détection et la quantification de l'histamine dans le poisson et les produits de la pêche. En ce qui concerne les exploitants des produits de la pêche, ceux-ci doivent s'assurer de la sécurité des produits qu'ils mettent sur le marché en vérifiant le respect des critères réglementaires pour l'histamine au travers de leur stratégie de contrôle en application de leur système HACCP. Ils peuvent utiliser d'autres procédures d'échantillonnage et d'essai dans la mesure où ils démontrent que ces procédures fournissent des garanties au moins équivalentes, comme mentionné dans l'article 5 du règlement (CE) n°2073/2005².

Pour démontrer cette équivalence de garanties de sécurité pour le consommateur, il apparaît nécessaire de disposer des caractéristiques obtenues pour les performances essentielles et les niveaux de validation de chacune des méthodes alternatives qualitatives et/ou quantitatives pour en déterminer l'adéquation aux contrôles opérés par les professionnels.

L'article 5 du règlement précise que les méthodes alternatives doivent être validées par rapport à la méthode de référence (CLHP selon la norme EN ISO 19343 depuis 2019 dans le cas de l'histamine) selon le protocole de la norme EN ISO 16140-2 ou d'autres protocoles analogues reconnus au niveau international. De plus, s'il s'agit de méthodes commercialisées, elles doivent être certifiées par une tierce partie.

Il se trouve qu'en ce qui concerne le critère de l'histamine dans le poisson et les produits de la pêche, la norme EN ISO 16140-2 (Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence) n'est pas applicable car principalement destinée à l'analyse de bactéries. Ceci explique pourquoi les fabricants de méthodes alternatives ont eu recours à d'autres protocoles de validation proposés au niveau international, plus particulièrement par l'AOAC International (USA) pour avoir une reconnaissance de l'aptitude de leur méthode à produire un niveau de sécurité du poisson et des produits de la pêche répondant à la réglementation.

1.2 Objet de la demande

L'Anses a été saisie le 30 mars 2025 par la Direction Générale de l'Alimentation pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'appui scientifique et technique relatif à

¹ Principe de la méthode NF EN ISO 19343 : Les échantillons sont extraits par une solution acide puis dérivatisés avec du chlorure de dansyle. L'histamine est séparée des autres amines biogènes par chromatographie liquide haute performance (CLHP) et quantifiée par UV à 254 nm.

² Limite "M" : 200 mg/Kg (Produits de la pêche fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine) ou 400 mg/Kg (Produits de la pêche ayant subi un traitement de maturation aux enzymes dans la saumure, fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine)

l'appréciation des performances des méthodes alternatives utilisées dans le cadre d'autocontrôles pour le dosage de l'histamine.

Cette saisine comporte quatre questions :

1. Réaliser un parangonnage des différents tests sur la base de l'étude des dossiers de performances disponibles avec appréciation de leur performance.
2. Indiquer dans quel cadre (à partir de quelle teneur lors d'un autocontrôle) et selon quelles modalités (nouvel échantillonnage ou même broyat que celui analysé) une analyse de confirmation avec la méthode ISO 19343 devrait être réalisée.
3. Préciser si des lignes directrices sont disponibles concernant la préparation de l'échantillon analytique (ex. taille minimale de l'homogénéat en fonction de la taille du lot, autre...), et permettant de maintenir un niveau de représentativité minimum.
4. Lorsque des regroupements d'échantillons intra-lot sont réalisés par les opérateurs dans le cadre d'autocontrôles recourant au test ELISA quantitatif, indiquer les règles à respecter pour que le résultat soit interprétable, le cas échéant.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Janvier 2024) ».

L'expertise a été réalisée en interne, au sein de l'Unité Sécurité sanitaire des produits d'origine aquatique (U_SANAQUA), Laboratoire de sécurité sanitaire des aliments, site de Boulogne-sur-Mer, qui est LNR Histamine dans les produits de la pêche et de l'aquaculture.

Pour la réponse à la question 4, un appui a été apporté par l'Unité d'Évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM), de la Direction de l'Évaluation des risques.

Le Comité d'experts spécialisés « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (CES BIORISK) a été consulté et a émis des commentaires sur l'ensemble du projet de rapport lors de sa réunion du 19 novembre 2025.

2 Question 1 : « Réaliser un parangonnage des différents tests sur la base de l'étude des dossiers de performances disponibles avec appréciation de leur performance »

Avant de présenter les différentes méthodes alternatives disponibles sur le marché français, il est important de présenter les différents cadres de validation et/ou certification auxquels certaines des méthodes ont été soumises pour répondre au plus près à la réglementation.

Quelques organismes sont référencés dans le domaine de la validation/certification de méthodes pour les critères microbiologiques, comme AOAC International, NordVal International (structure intégrée dans NMKL -Nordic-Baltic Committee on Food Analysis), Microval (opéré par le NEN, organisme hollandais de normalisation) ou NF Validation (opéré par Afnor Certification). A notre connaissance, le seul organisme ayant validé des méthodes alternatives relatives au critère de sécurité « histamine » dans le poisson et les produits de la pêche est AOAC International.

AOAC International intervient dans le domaine de l'alimentation et de l'agriculture afin de permettre aux industriels de développer des méthodes innovantes, en relation étroite avec les laboratoires d'analyses et autres parties prenantes, en produisant des documents harmonisés. Il peut s'agir de « normes », de méthodes d'analyse validées, et de programmes pour contribuer à la mise en œuvre du management de la qualité. Ces documents n'ont pas un objectif initial d'application réglementaire. Néanmoins, ils servent d'appui à la validation et certification pour les méthodes alternatives proposées par les fabricants.

Pour ce qui concerne l'analyse d'histamine dans le poisson et produits de la pêche, les programmes clés d'AOAC International sont :

1/ Le programme des méthodes « OMA : Official Methods of Analysis »³. Il s'agit de la publication de méthodes considérées comme officielles par AOAC International, reposant notamment sur l'organisation d'un essai interlaboratoires.

2/ Le programme du Research Institute pour la certification « Performance Tested Methods » des méthodes alternatives (puisque la norme NF EN ISO 16140-2 n'est pas applicable, *cf. infra* 2.1.1), qui ne fait pas appel à l'organisation d'un essai interlaboratoires.

2.1 Référentiel AOAC utilisés pour la certification des méthodes alternatives pour le dosage de l'histamine dans le poisson et les produits de la pêche

2.1.1 Annexe F

Cette annexe présente les lignes directrices pour les exigences de performance des méthodes normalisées (SMPR).

Ces exigences SMPR constituent un concept important pour le domaine des méthodes analytiques alimentaires. Il s'agit de normes consensuelles volontaires, élaborées par les parties prenantes, qui prescrivent les exigences minimales de performance analytique pour les classes de méthodes et l'évaluation de l'adéquation d'une méthode à son usage prévu (Fit-for-Purpose »).

³ AOAC Official Method 977.13 – Histamine in Seafood – Fluorimetric Method – Codex-Adopted-AOAC Method

2.1.2 Annexe M

Ce guide de validation décrit des procédures de validation des méthodes ELISA quantitatives pour les allergènes alimentaires : Guide communautaire et bonnes pratiques » (Annexe M des Méthodes d'analyse officielles publiées en 2009). Il a aussi été utilisé pour les méthodes ELISA appliquées au dosage de l'histamine.

Il existe deux types de niveau de validation :

- SM1

Ce document a pour objectif de fournir les lignes directrices de l'AOAC International aux développeurs de méthodes menant des études de validation de méthodes d'analyse d'allergènes alimentaires par immuno-essai, par exemple pour une demande de certification AOAC Official Methods of Analysis® (OMA) et/ou Performance Tested Methods (PTM), ou aux développeurs de méthodes individuels menant des validations intra-laboratoires (SLV).

- SM2

Ces lignes directrices s'appliquent aux méthodes quantitatives et qualitatives de mesure des allergènes alimentaires, qu'elles soient brevetées (commercialisées) ou non.

2.2 Analyse des différents types de méthodes alternatives

La teneur en histamine dans le poisson peut être déterminée en utilisant différents types de méthodes analytiques. Ces méthodes peuvent être classées en différentes catégories en fonction de la nature de leur réponse, de leur facilité de mise en œuvre, de leur coût et de leur objectif.

Nous reportons ci-après les catégories de méthodes, et les principaux tests disponibles sur le marché français notamment, leurs performances connues, leur adéquation à leur usage en relation avec un objectif d'autocontrôle par les professionnels dans le cadre de leur plan de maîtrise sanitaire des produits. Il est important de préciser que nous nous baserons sur les données publiées par les fabricants. De plus, il ne sera pas possible de faire une analyse critique de ces données de validation/certification car elles ne sont pas obtenues dans les mêmes conditions comme celles d'un essai interlaboratoires de validation de méthode.

2.2.1 Méthodes basées sur le principe immunochromatographique à flux latéral

Principe : Un extrait d'échantillon est déposé en début de bandelette (membrane) sur laquelle est fixé un anticorps spécifique de l'histamine. En présence de ce dernier dans l'échantillon, un complexe analyte/anticorps va alors se former et migrer le long de la bandelette par capillarité jusqu'à ce qu'il se conjugue à nouveau avec un anticorps de révélation, aboutissant à la formation d'une ligne colorée. Une réaction de contrôle donnant systématiquement une ligne colorée est intégrée de manière à valider la bonne réalisation du test. Des systèmes de lecture des résultats peuvent être utilisés afin de quantifier la réponse obtenue. Les résultats de la comparaison de trois tests provenant de deux fournisseurs sont présentés dans le Tableau 1.

2.2.2 Méthodes basées sur le principe de dosage enzymatique

Principe : Après extraction, l'échantillon filtré est mis en contact avec une solution enzymatique (par ex. histamine deshydrogénase) qui catalyse l'oxydation de l'histamine. En présence d'un réactif, l'histamine oxydée entraîne la formation d'un composé coloré dont l'intensité varie en fonction de la quantité d'histamine présente dans l'échantillon soumis à essai. Ce type de test permet de quantifier l'histamine soit de manière visuelle, soit par lecture de l'absorbance avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde adaptée. Les résultats de la comparaison de cinq tests provenant de cinq fournisseurs sont présentés dans le Tableau 2

2.2.3 Méthodes basées sur le principe de dosage enzymatique via l'utilisation de biocapteur

Principe : Il repose sur un biosenseur enzymatique spécifique qui détecte l'histamine par une réaction enzymatique produisant un signal électrochimique.

L'extrait d'échantillon (poisson cru, cuit, en conserve, farine de poisson, etc.) est injecté dans une cellule électrochimique contenant une électrode en or modifiée ; l'enzyme immobilisée y catalyse l'oxydation de l'histamine et génère des produits détectables électrochimiquement (dosage ampérométrique). La quantité d'histamine présente est proportionnelle à la quantité de produits formés lors de cette réaction d'oxydation. Un seul fournisseur (Biolan, Zamundio, Espagne) propose ce type de méthode (Tableau 3).

2.2.4 Méthodes basées sur le principe de dosage ELISA

Principe : il s'agit d'une technique de dosage qui repose sur une réaction immunologique permettant la détection d'un antigène ou d'un anticorps. La réaction antigène-anticorps est visualisée suite à une réaction enzymatique colorimétrique grâce au couplage d'une enzyme à l'anticorps. Il existe plusieurs types de méthode ELISA. Concernant l'histamine, la principale méthode utilisée est la méthode ELISA compétitive qui repose sur un principe de compétition pour se lier à un anticorps spécifique entre l'histamine présente dans l'échantillon et de l'histamine marquée ajoutée. La détection se fait après des étapes d'immobilisation de l'anticorps, de compétition et de lavage. Le signal observé sera inversement proportionnel à la concentration en histamine. Les résultats de la comparaison de quatre tests provenant de quatre fournisseurs sont présentés dans le Tableau 4.

Toutes les informations dans les tableaux ci-après sont issues directement des documents mis à disposition par les fabricants/fournisseurs.

Tableau 1 : Comparaison des différentes méthodes immunochromatographiques

	Reveal® for histamine (NEOGEN)	Reveal® Q+ for histamine (NEOGEN)	Symmetric Histamine (PROGNOSIS-BIOTECH)
<i>Principe</i>	immunochromatographie à flux latéral	immunochromatographie à flux latéral	immunochromatographie à flux latéral
<i>Type de réponse</i>	qualitative	quantitative	quantitative
<i>Limite de détection</i>	50 mg/kg	0,5 mg/kg	5,3 mg/kg
<i>Limite de quantification</i>	NR	1,5 mg/kg	8 mg/kg
<i>Certification</i>	NR	NR	NR
<i>Gamme analytique</i>	NR	1,5 à 40 mg/kg	8 à 300 mg/kg
<i>Quantité échantillon</i>	10 g (après homogénéisation)	10 g (après homogénéisation)	10 g (après homogénéisation)
<i>Spécificité (absence de réaction croisée)</i>	oui	oui	oui
<i>Durée de préparation éch.</i>	10 min	10 min	10 min
<i>Durée de l'analyse</i>	5 min	5 min	3 min
<i>Contrôle interne</i>	oui	oui	NR

NR : non renseigné/réalisé

Tableau 2 : Comparaison des différentes méthodes basées sur le principe de dosage enzymatique colorimétrique

	Ridascreen Histamine (r-Biopharm)	BioSystem Y 15 (BioSYSTEM)	QuantiQuik™ Histamine^{Rapid test} (NOVAKITS/LDN)	Histamine test (KIKKOMAN BIOCHEMIFA COMPAGNY)	MaxSignal Histamine Enzymatic assay (PerkinElmer)
<i>Principe</i>	Réaction enzymatique colorimétrique	Méthode enzymatique colorimétrique	Réaction enzymatique colorimétrique	Réaction enzymatique colorimétrique	Réaction enzymatique colorimétrique
<i>Type de réponse</i>	quantitative	quantitative	semi-quantitative	quantitative	quantitative
<i>Limite de détection</i>	0,75 mg/kg	NR	20 mg/kg	NR	3 mg/kg
<i>Limite de quantification</i>	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	NR
<i>Certification</i>	AOAC PTM SM #031901	AOAC PTM SM #072001	NR	AOAC PTM SM #041802	AOAC PTM SM 051701
<i>Gamme analytique</i>	2 à 100 mg/kg	10 à 200 mg/kg	20 à 400 mg/kg	10 à 150 mg/kg	NR
<i>Quantité échantillon</i>	5 g (après homogénéisation)	5 g (après homogénéisation)	0,5 g	1 g (homogénéat au moins 10 g)	4 g (homogénéat au moins 40 g)
<i>Spécificité (absence de réaction croisée)</i>	oui	Agmatine (6,3%)	NR	Agmatine et putrescine	Agmatine et putrescine (<5%)
<i>Durée de préparation éch.</i>	35 min (10 éch.)	45 min	5 min	25 min	20 min
<i>Durée de l'analyse</i>	15 min	10 min	5 min	20 min	10 min
<i>Contrôle interne</i>	oui	oui	NR	oui	oui

NR : non renseigné/réalisé

Tableau 3 : Comparaison des différentes méthodes basées sur le principe de dosage enzymatique via des bio-capteurs

	BIOFISH3000 Histamine BIOLAN
<i>Principe</i>	Biocapteur spécifique enzymatique
<i>Type de réponse</i>	quantitatif
<i>Limite de détection</i>	NR
<i>Limite de quantification</i>	5 mg/kg
<i>Certification</i>	AOAC PTM SM # 051604
<i>Gamme analytique</i>	5-50 ou 10-100 mg/kg
<i>Quantité échantillon</i>	2 g
<i>Spécificité (absence de réaction croisée)</i>	oui
<i>Durée de préparation éch.</i>	5 min
<i>Durée de l'analyse</i>	2 min
<i>Contrôle interne</i>	oui

NR : non renseigné/réalisé

Tableau 4 : Comparaison des différentes méthodes basées sur le principe de l'ELISA

	Histasure ELISA Fast Track (NOVAKITS-LDN)	Veratox (NEOGEN)	BioShield Histamine (ProGnosis biotech)	HISTAMARINE (BECKMAN COULTER)
<i>Principe</i>	ELISA (mode compétitif indirect)	ELISA (mode compétitif direct)	ELISA	ELISA
<i>Type de réponse</i>	Quantitatif	Quantitatif	Quantitatif	Quantitatif
<i>Limite de détection</i>	NR	2 mg/kg	2 mg/kg	0,3 mg/kg
<i>Limite de quantification</i>	3 mg/kg	2,5 mg/kg	2,5 mg/kg	1 mg/kg
<i>Certification</i>	AOAC PTM SM #021402	AOAC PTM SM #070703	AOAC PTM SM #051604	AOAC PTM SM #980802
<i>Gamme analytique</i>	3 à 300 mg/Kg	2,5 à 40 mg/kg	2,5 à 200 mg/kg	1 à 500 mg/kg
<i>Quantité échantillon</i>	10 g	10 g	10 g (ou 5 g)	1 à 10 g
<i>Spécificité (absence de réaction croisée)</i>	oui	oui	oui	oui
<i>Durée de préparation éch.</i>	15 min	10 min	10 min	10 min
<i>Durée de l'analyse</i>	25 min	25 min	20 min	48h + 1h10
<i>Contrôle interne</i>	oui	oui	oui	oui

NR : non renseigné/réalisé

3 Question 2 : « Indiquer dans quel cadre (à partir de quelle teneur lors d'un autocontrôle) et selon quelles modalités (nouvel échantillonnage ou même broyat que celui analysé) une analyse de confirmation avec la méthode NF EN ISO 19343 devrait être réalisée. »

Sur la base de la norme EN ISO 16140-2, référencée dans le règlement (CE) n°2073/2005, les résultats obtenus avec des méthodes alternatives validées selon cette norme n'ont pas d'exigence de confirmation par la méthode de référence.

Néanmoins, cette norme n'est pas applicable pour le critère histamine dans le poisson et les produits de la pêche. En revanche, il apparaît que la validation et a fortiori la certification par AOAC International (ou tout autre organisme de certification) associés au fait que l'utilisateur a démontré la maîtrise de la mise en œuvre régulière de la méthode (notion de vérification de méthode), permet de considérer que le résultat est fiable et qu'il n'y a pas à réaliser d'analyse de confirmation par la méthode de référence EN ISO 19343.

Par ailleurs, il faut souligner qu'un projet de norme (ISO NP 16140-9 : Protocol for the validation of alternative methods for preformed bacterial toxins or biogenic amines in food intended for human consumption), est actuellement en préparation par le WG 3 « Validation de méthodes » de l'ISO/TC 34/SC 9 « Produits alimentaires-Microbiologie » afin de définir un protocole de validation des méthodes alternatives d'analyse d'amines biogènes (dont histamine) dans les aliments.

- *Dans l'attente du développement et de la publication de la norme ISO 16140-9, il est recommandé l'utilisation de méthodes commercialisées certifiées par un organisme tiers (ex AOAC PTMSM) (cf article 5 du règlement 2073/2005).*
- *Concernant l'utilisation des méthodes commercialisées certifiées : au-delà de la mise en œuvre par les utilisateurs des bonnes pratiques de laboratoire, il convient de porter une attention toute particulière à l'obtention d'un homogénat de tissus/chairs à partir duquel peser la prise d'essai préconisée par les fabricants/fournisseurs. De plus, il faut également s'assurer de la réalisation des contrôles métrologiques des équipements critiques (pipettes, balances, incubateurs, appareils de mesure ...), de la qualité des réactifs (y compris kits) ainsi que l'évaluation de l'incertitude de mesure associée à la méthode. De manière globale, il est recommandé que la maîtrise du savoir-faire du laboratoire soit validée par la participation à au moins un essai interlaboratoires d'aptitude par an.*

4 Question 3 : Préciser si des lignes directrices sont disponibles concernant la préparation de l'échantillon analytique (ex. taille minimale de l'homogénat en fonction de la taille du lot, autre...), et permettant de maintenir un niveau de représentativité minimum.

En préambule, il est important de rappeler des éléments de définition du règlement (CE) n°2073/2005 modifié, article 2, points e, j et k :

« e) «lot» un groupe ou une série de produits identifiables obtenus par un procédé donné dans des conditions pratiquement identiques et produits dans un endroit donné et au cours d'une période de production déterminée;

j) «échantillon» un ensemble composé d'une ou de plusieurs unités ou une portion de matière, sélectionné par différents moyens dans une population ou dans une quantité importante de matière et destiné à fournir des informations sur une caractéristique donnée de la population ou de la matière étudiée et à constituer la base d'une décision concernant la population ou la matière en question ou concernant le procédé qui l'a produit;

k) «échantillon représentatif» un échantillon dans lequel on retrouve les caractéristiques du lot d'où il provient. C'est notamment le cas lorsque chacun des individus ou des prélèvements élémentaires à choisir dans le lot a la même probabilité de figurer dans l'échantillon »

Pour assurer la représentativité de la prise d'essai pour la préparation de l'échantillon, il faut assurer le lien jusqu'à la représentativité du lot analysé (Figure 1).

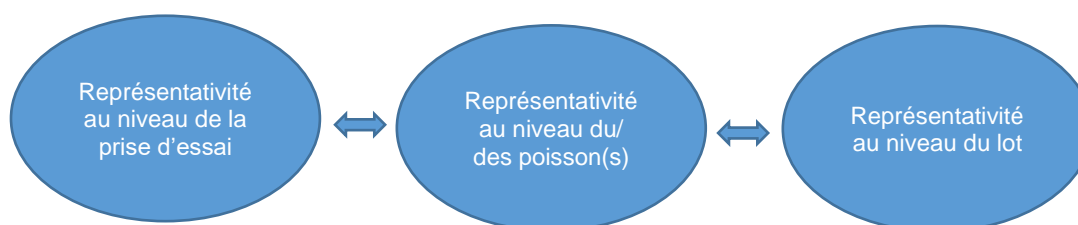


Figure 1 : Représentation des différents niveaux de représentativité

Il est possible de trouver des éléments de lignes directrices dans les trois documents évoqués ci-après :

- Le document « AOAC Official Method 937.07 Fish and Marine Products, Treatment and Preparation of Sample Procedure » (1996), annexe 2, apporte des lignes directrices quant au prélèvement et à la préparation de l'échantillons pour différents types de produits (poissons frais, en conserve, salés, fumés et congelés).
- De plus, dans son avis de 2022 relatif à la saisine n°2021-SA-0021, l'Anses a émis des recommandations concernant les zones à prélever sur les poissons (§3.2.4) : « L'analyse bibliographique sur l'hétérogénéité de la contamination du muscle indique que la queue n'est pas une zone pertinente pour réaliser les prélèvements. Pour les poissons de grande taille, les prélèvements devraient être effectués en surface des zones connues comme étant souvent les plus contaminées : en surface des muscles,

à proximité des zones de coupes, sur les zones en contact avec les viscères. Compte-tenu de l'état des connaissances, il est difficile de définir l'épaisseur des prélèvements de surface. La réalisation d'une étude technique permettrait de valider les méthodes de prélèvement des muscles, la profondeur des prélèvements et les points de repères anatomiques. »

- Concernant notamment la quantité nécessaire à prélever, le document « Code of practice for fish and fishery products » (FAO/WHO/Codex Alimentarius) (2020) propose dans le paragraphe 10.2.4.3 : « The part of the fish selected for testing can significantly affect the test results. Test portions should be cut from the head-end of the lower loin near the gills because that area has the highest probability of elevated histamine in raw fish at risk. Sufficient representation of fish muscle should be collected to prepare for analysis (e.g. 100–250 g). The weight of the representative sample unit may depend on the product and sampling strategy. For smaller fish, in addition to the lower anterior loin portion, the upper anterior loin, and the mid-section of the lower loin, in that order, can also be collected. For very small fish, multiple fish may need to be collected to acquire a representative sample unit. The entire sample unit should be thoroughly combined so that the smaller aliquot used for the analytical method is representative of the entire sample unit.” Au-delà des zones de prélèvement à privilégier, il est recommandé de prélever 100-250 g

De manière plus globale, ce document évoque également les stratégies d'échantillonnage spécifiquement pour l'analyse d'histamine dans le paragraphe 10.2.4.

Pour information, le LNR histamine recommande un prélèvement minimum de 50 g dans le cadre des analyses réglementaires avec la méthode ISO 19343:2017. Ceci permet de garantir l'homogénéité de la prise d'essai (5 g) tout en limitant l'impact de la quantité prélevée notamment lors de la vente au détail.

5 Question 4 : Lorsque des regroupements d'échantillons intra-lot sont réalisés par les opérateurs dans le cadre d'autocontrôles recourant au test ELISA quantitatif, indiquer les règles à respecter pour que le résultat soit interprétable, le cas échéant.

Dans le cadre de certains autocontrôles, les opérateurs peuvent regrouper plusieurs unités d'un même lot (« pooling ») avant l'analyse au moyen d'un test ELISA quantitatif, notamment afin d'optimiser les ressources analytiques.

Afin d'évaluer dans quelles conditions un tel regroupement pourrait fournir un résultat interprétable au regard du critère microbiologique, des simulations ont été conduites pour comparer les performances d'un plan d'échantillonnage classique ($n = 9, c = 2, m, M$)⁴ et celles d'un plan utilisant un pool unique composé de 9 unités.

Les résultats et leur interprétation sont présentés dans les sections ci-après.

5.1 Non-équivalence entre échantillons regroupés (pooling) et plan d'échantillonnage classique

Une comparaison statistique (basée sur la probabilité d'accepter un lot) a été conduite entre :

- un plan d'échantillonnage classique conforme au critère $n = 9, c = 2, m, M$, fondé sur l'analyse individuelle de neuf unités du lot ;
- un plan basé sur un test unique réalisé sur un pool de neuf unités (et le respect de m).

Le tableau 5 présente les probabilités d'accepter des lots présentant différentes caractéristiques (3 lots différents avec des niveaux de contamination similaires à ceux utilisés pour l'avis de l'Anses de 2022 relatif à la saisine n°2021-SA-0021).

Tableau 5 : Probabilités d'acceptation d'un lot en fonction de scénarios de contamination intra-lot en histamine

log ₁₀ [histamine]~Normale(moyenne ; écart type)		Probabilité d'accepter le lot avec le plan classique	Probabilité d'accepter le lot avec pooling
Moyenne	Ecart type		
1,79	0,5	0,154	0,46
1,00	0,5	0,958	0,999
0,5	0,5	0,999	1

Les résultats des simulations présentés dans le Tableau 5 montrent que l'utilisation de pools conduit systématiquement à une diminution de la probabilité de détecter des niveaux élevés

⁴ n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M (limites minimales et maximales), pour le nombre d'échantillons n réalisé (RÈGLEMENT (CE) No 2073/2005 DE LA COMMISSION du 15 novembre 2005 modifié serait concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires)

d'histamine, du fait de l'effet de dilution. À niveaux de contamination identiques, la probabilité d'accepter un lot avec une contamination est en effet plus élevée lorsqu'il est analysé sous forme de « pool » que lorsqu'il est analysé selon le plan classique. Cet effet est d'autant plus marqué que le niveau moyen de contamination diminue. Ces résultats montrent que l'application des mêmes seuils m et M à des échantillons individuels et à des pools n'est pas appropriée.

5.2 Absence de justification scientifique pour l'utilisation du même seuil m/M sur un pool

La concentration mesurée sur un pool correspond à une moyenne arithmétique des concentrations individuelles. La signification du dépassement de m diffère donc selon que l'on considère une unité individuelle ou une valeur moyenne provenant d'un pool. La probabilité de dépasser m avec un échantillon poolé est fortement réduite, même lorsque plusieurs unités individuelles dépassent ce seuil. Par conséquent, l'utilisation d'un seuil identique pour des unités individuelles et des échantillons poolés ne repose pas sur une base scientifique solide.

Des simulations montrent qu'il serait théoriquement possible de définir un seuil spécifique pour les pools (m_{pool}), inférieur à m , qui conduirait à une probabilité d'acceptation équivalente à celle du plan classique (cf annexe 3).

Toutefois, ce seuil dépend intégralement de la distribution de contamination au sein du lot (moyenne, variabilité, nature de la distribution) laquelle n'est ni facilement mesurable en routine ni uniforme selon les espèces, les pratiques de découpe ou les conditions de conservation. En conséquence, il n'existe pas de seuil m_{pool} , unique permettant de garantir une équivalence robuste entre une analyse poolée et le plan d'échantillonnage individuel réglementaire.

En conclusion et en l'état actuel des connaissances, et au regard :

- de l'effet de dilution inhérent au pooling ;
- de l'absence d'équivalence statistique avec les plans d'échantillonnage réglementaires ;
- de l'impossibilité de définir un seuil m poolé applicable de manière générique ;
- et du fait que les critères microbiologiques sont définis pour des analyses individuelles ;

le regroupement d'échantillons intra-lot ne peut pas être utilisé pour une analyse quantitative visant à conclure sur la conformité d'un lot, sauf validation spécifique démontrant une équivalence avec le plan d'échantillonnage classique.

6 Conclusion générale

Au terme de cette analyse, l'expertise conduite par le LNR Histamine apporte un éclairage sur les performances et les limites des méthodes alternatives utilisées dans le cadre des autocontrôles pour le dosage de l'histamine dans les produits de la pêche. L'étude des dossiers fournis par les fabricants montre que ces méthodes, bien que reposant sur des principes analytiques variés (immunochromatographie, dosages enzymatiques, biocapteurs, ELISA), présentent des niveaux de sensibilité, de spécificité et d'aptitude à l'usage hétérogènes. Leur évaluation repose exclusivement sur les données disponibles, sans possibilité d'harmoniser ou de comparer strictement leurs performances, en l'absence d'essais interlaboratoires réalisés dans des conditions standardisées (hors de la demande de cette saisine).

Concernant l'usage de ces méthodes dans le cadre d'autocontrôles, l'expertise confirme qu'en l'état actuel de la réglementation, une confirmation systématique par la méthode de référence NF EN ISO 19343 n'est pas nécessaire lorsque les méthodes alternatives sont certifiées par un organisme tiers indépendant (comme l'AOAC PTM) et qu'elles sont mises en œuvre dans un système maîtrisé, incluant la vérification métrologique régulière des équipements, des réactifs, la formation des opérateurs et la participation à des essais interlaboratoires d'aptitude.

L'analyse rappelle également l'importance de la représentativité des échantillons, depuis le prélèvement dans le lot jusqu'à la prise d'essai utilisée pour la mesure. Les recommandations issues des documents de référence internationaux (AOAC, Codex Alimentarius, avis de l'Anses) fournissent un socle solide pour harmoniser les pratiques de prélèvement, notamment dans les espèces de grande taille ou en cas d'hétérogénéité intracorporelle.

Enfin, les simulations consacrées au regroupement d'échantillons (pooling) confirment que cette pratique ne peut être considérée comme équivalente au plan d'échantillonnage réglementaire.

Dans ce contexte, le rapport souligne l'importance de poursuivre les efforts visant à encadrer et harmoniser la validation des méthodes alternatives, notamment à travers l'avancée des travaux sur la future norme ISO 16140-9, dédiée à la validation de méthodes alternatives de toxines préformées et d'amines biogènes. La mise en place de telles lignes directrices contribuera à renforcer l'assurance qualité des autocontrôles, la robustesse des décisions prises par les opérateurs de la filière pêche.

Date de validation du rapport : 22/04/2026

7 Bibliographie

Anses (2022). Avis de l'Anses relatif à la représentativité de l'échantillonnage pour la recherche d'histamine dans les poissons (saisine n° 2021-SA-0021. Maisons-Alfort : 38p.)

AOAC, 1996. Official Method 937.07 Fish and Marine Products. Treatment and Preparation of Sample Procedure.

CE (2005). Règlement (CE) n°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JO UE 22/12/05, L 338:1.

FAO and WHO. 2020. Code of Practice for Fish and Fishery Products. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb0658en>

ISO 19343:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Détection et quantification de l'histamine dans le poisson et les produits de la pêche. Méthode CLHP.

ISO 16140-2 :2016/A1 :2024. Microbiologie de la chaîne alimentaire – Validation des méthodes – Partie 2 : Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence.

UE (2019). Règlement (UE) n° 2019/229 de la commission du 7 février 2019 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires en ce qui concerne certaines méthodes, le critère de sécurité des denrées alimentaires relatif à la présence de *Listeria monocytogenes* dans les graines germées, ainsi que le critère d'hygiène du procédé et le critère de sécurité des denrées alimentaires pour les jus de fruits et de légumes non pasteurisés (prêts à être consommés). JO UE 07/02/19, L 37:106

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de la demande



**MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA SOUVERAINETÉ
ALIMENTAIRE**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

**Direction générale
de l'alimentation**

La Directrice générale de l'alimentation

à

Monsieur le Directeur général
Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du tra-
vail

4 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex

Service des actions sanitaires
Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments
Bureau des produits de la mer et d'eau douce
Dossier suivi par : Virginie Hossen
Tél: 07 64 51 09 69
Mèl: virginie.hossen@agriculture.gouv.fr
N/Réf:

Paris, le 30 mars 2025

Objet : Demande d'appui scientifique et technique de l'ANSES pour apprécier les performances des méthodes alternatives utilisées dans le cadre d'autocontrôles pour le dosage de l'histamine

Pièce jointe : Synthèse de l'enquête du CITPPM

J'ai l'honneur de solliciter l'expertise et l'appui scientifique et technique du Laboratoire National de Référence Histamine dans les produits de la pêche sur les performances analytiques des principaux tests commerciaux utilisés dans le cadre des autocontrôles des professionnels pour le dosage de l'histamine afin de mieux encadrer leur utilisation.

Contexte

Pour les autocontrôles analytiques portant sur l'histamine, le nombre d'échantillons et la méthode d'analyse retenus peuvent différer des dispositions de l'annexe I du R(UE) n°2073/2005 sous réserve que l'opérateur ait démontré la pertinence du plan d'échantillonnage mis en œuvre et la comparabilité des résultats de la méthode alternative avec ceux obtenus par la méthode officielle HPLC NF EN ISO 19343.

Ainsi, l'utilisation de tests rapides, de type bandelette qualitative ou tests ELISA quantitatifs par exemple, permet, par rapport à la méthode officielle, de traiter rapidement et à moindre coût un nombre important d'échantillons. Dans tous les cas, il est de-

mandé, comme indiqué dans l'avis de l'Anses n°2021-SA-0021, que les laboratoires appliquant ces tests participent régulièrement à des essais inter-laboratoires d'aptitude pour vérifier la bonne mise en œuvre des méthodes qu'ils utilisent.

Cela étant, du fait de la variabilité de contamination au sein d'un même lot (surtout si constitué de plusieurs gros individus), il pourrait être possible de déclarer le lot conforme après analyse de 9 échantillons par la méthode de référence NF EN ISO 19343 basée sur l'HPLC, tandis que le résultat ou les résultats de la méthode de dépistage utilisée dans le cadre de l'autocontrôle révélerait une teneur en histamine supérieure à la teneur maximale réglementaire de 200 mg/kg.

Il s'avère donc indispensable de disposer d'informations fiables sur les performances analytiques et l'utilisation des méthodes alternatives couramment utilisées par les opérateurs pour prendre des mesures de gestion les plus adaptées possibles.

Portée de l'appui scientifique et technique demandé

Sur la base de l'enquête réalisée auprès des différentes entreprises adhérentes de la CITPPM mettant sur le marché des poissons appertisés, jointe à la présente, je vous saurais gré de bien vouloir :

1. Réaliser un parangonnage des différents tests sur la base de l'étude des dossiers de performances disponibles avec appréciation de leur pertinence.
2. Indiquer dans quel cadre (à partir de quelle teneur lors d'un autocontrôle) et selon quelles modalités (nouvel échantillonnage ou même broyat que celui analysé) une analyse de confirmation avec la méthode NF EN ISO 19343 devrait être réalisée.
3. Préciser si des lignes directrices sont disponibles concernant la préparation de l'échantillon analytique (ex. taille minimale de l'homogénat en fonction de la taille du lot, autre...), et permettant de maintenir un niveau de représentativité minimum
4. Lorsque des regroupements d'échantillons intra-lot sont réalisés par les opérateurs dans le cadre d'autocontrôles recourant au test ELISA quantitatif, indiquer les règles à respecter pour que le résultat soit interprétable, le cas échéant.

Délai souhaité

Une réponse est souhaitée au plus tard le 31/07/2025 pour les trois premières questions.

Pour la 4^{ème} question, une réponse est souhaitée pour la fin du 1^{er} semestre 2026.

Mes services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire.

Je vous remercie de bien vouloir accuser réception de la présente demande.

P/La Directrice générale de l'alimentation

Marie- Christine
Marie- Christine
LE GAL ID LE GAL ID

Marie-Christine LE GAL

Directrice générale adjointe de l'alimentation

Destinataires pour la réponse mail :

- boîte institutionnelle du bureau métier : bpmed.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr
- chargé(e) de mission responsable du dossier : virginie.hossen@agriculture.gouv.fr
- boîte institutionnelle du BGIR : saisines-anses.dgal@agriculture.gouv.fr

Annexe 2 : AOAC Official Method 937.07

35.1.01

AOAC Official Method 937.07
Fish and Marine Products
Treatment and Preparation of Sample
Procedure
First Action 1937
Final Action 1996

To prevent loss of H₂O during preparation and subsequent handling, use test portions as large as practicable. Keep ground material in container with air-tight cover. Begin all determinations as soon as practicable. If any delay occurs, chill test portions to inhibit decomposition. In general, prepare test portion of fish as it is usually prepared by consumer, by including skin and discarding bones, but subject to overall rule of edibility, e.g., inedible catfish skin is discarded; softened canned salmon bones are included; sardines are examined whole. Instructions may be modified in accordance with purpose of specific examination. Prepare test portion for analysis as follows:

(a) *Fresh fish*.—Clean, scale, and eviscerate fish. In case of small fish 6 in. (≤15 cm), use 5–10 fish. In case of large fish, from each of ≥3 fish cut 3 cross-sectional slices 1 in. (2.5 cm) thick, 1 slice from just back of pectoral fins, 1 slice halfway between first slice and vent, and 1 slice just back of vent. Remove bone. For intermediate-size fish, remove and discard heads, scales, tails, fins, guts, and inedible bones; fillet fish to obtain all flesh and skin from head to tail and from top of back to belly on both sides. For determination of fat and fat-soluble components, skin must be included, since many fish store large amounts of fat directly beneath skin.

Pass test portion sample rapidly through meat chopper 3 times. Remove unground material from chopper after each grinding and mix thoroughly with ground material. Meat chopper should have holes as small as practicable (1.5–3 mm [$\frac{1}{16}$ – $\frac{1}{8}$ in.] diameter) and should not leak around handle end. As alternative for soft fish,

high-speed blender may be used. Blend several minutes, stopping blender frequently to scrape down sides of cup.

(b) *Canned fish, shellfish, and other canned marine products*.—Place entire contents of can (meat and liquid) in blender and blend until homogeneous or grind 3 times through meat chopper. For large cans, drain meat 2 min on No. 8–12 sieve and collect all liquid. Determine weight of meat and volume of liquid. Recombine test portion of each in proportionate amounts. Blend test recombined portions in blender (or grind) until homogeneous.

(c) *Canned marine products packed in oil, sauce, broth, or water*.—Drain 2 min on No. 8 sieve. Prepare solid test portion as in (b). Liquid may be analyzed separately, if desired, or reincorporated with solids. H₂O is usually discarded.

(d) *Fish packed in salt or brine*.—Drain and discard brine and rinse off adhering salt crystals with saturated NaCl solution. Drain again 2 min and proceed as in (a).

(e) *Dried smoked or dried salt fish*.—Proceed as in (a).

(f) *Frozen fish*.—Let thaw at room temperature, and discard draining. (1) *Fillet*.—Use entire piece. (2) *Whole fish*.—Proceed as in (a).

(g) *Shellfish other than oysters, clams, and scallops*.—If test sample is received in shell, wash as in (h) and separate edible test portions in usual way. Prepare edible test portion for analysis as in (a).

(h) *Shell oysters, shell clams, and scallops*.—Wash shells in potable H₂O to remove all loose silt and dirt, and drain well. Shuck enough oysters or clams into clean dry container to yield ≥500 mL (1 pt) drained meats. Transfer shellfish meats to skimmer, [953.11A](#) (see 35.1.07), pick out pieces of shell, drain 2 min on skimmer, and proceed as in (i) or (j).

(i) *Shucked clams or scallops*.—Prepare as in (b).

(j) *Shucked oysters*.—Blend meats, including liquid, 1–2 min in high-speed blender.

(k) *Breaded fish, raw or cooked*.—Do not remove breading or skin. Proceed as in (a).

References: *JAOAC* 20, 70(1937); 21, 85(1938); 35, 218(1952); 36, 608(1953); 38, 194(1955); 59, 312(1976).

Revised: March 1997

Annexe 3 : Scripts R utilisés pour les analyses (sections 5.1 et 5.2)

Script R – Section 5.1 (comparaison plan classique vs pooling)

```
### Paramètres globaux
n   <- 9
m   <- 2.0
M   <- 2.3
nsim <- 1e5

params <- list(
  list(mu = 1.79, sd = 0.5),
  list(mu = 1.0,  sd = 0.5),
  list(mu = 0.5,  sd = 0.5)
)

### Fonction : probabilité analytique d'acceptation (plan classique)
proba_accept_classique <- function(mu, sd, n, m, M) {
  p_le_m  <- pnorm(m, mean = mu, sd = sd)
  p_le_M  <- pnorm(M, mean = mu, sd = sd)
  p_between <- p_le_M - p_le_m

  p_acc <- 0
  for (k in 0:2) {
    p_acc <- p_acc + choose(n, k) * (p_between^k) * (p_le_m^(n - k))
  }
  p_acc
}

### Fonction : probabilité d'acceptation avec pooling
# Règle : lot accepté si log10(conc_pool) <= m
proba_accept_poole <- function(mu, sd, n, m, nsim) {
  sim <- replicate(nsim, {
    y <- rnorm(n, mean = mu, sd = sd) # log10(histamine)
    c_val <- 10^y # concentrations
    pool_conc <- mean(c_val)
    log10(pool_conc) <= m # TRUE = lot accepté
  })
  mean(sim)
}

### Boucle sur les 3 distributions
set.seed(123)

results <- data.frame(
  mu = numeric(),
```

```
sd = numeric(),
P_accept_classique = numeric(),
P_accept_poole = numeric()
)

for (p in params) {
  mu <- p$mu
  sd <- p$sd

  p_classic <- proba_accept_classique(mu, sd, n, m, M)
  p_pool <- proba_accept_poole(mu, sd, n, m, nsim)

  results <- rbind(results, data.frame(
    mu = mu,
    sd = sd,
    P_accept_classique = p_classic,
    P_accept_poole = p_pool
  ))
}

print(results)
```

Script R – Section 5.2 (estimation du seuil m_{pool} équivalent)

```
target_mu <- 1.0
target_sd <- 0.5
n <- 9
m <- 2.0
M <- 2.3
nsim <- 5e4

# 1. prob d'acceptation du plan classique (analytique)
P_acc_classique <- proba_accept_classique(target_mu, target_sd, n, m, M)

# 2. fonction qui donne P_acc_pool(m_pool)
P_acc_pool_fun <- function(m_pool_log10) {
  sim <- replicate(nsim, {
    y <- rnorm(n, mean = target_mu, sd = target_sd)
    c_val <- 10^y
    pool_conc <- mean(c_val)
    log10(pool_conc) <= m_pool_log10
  })
}
```

```
mean(sim) - P_acc_classique # on cherche la racine = 0  
}
```

3. Recherche de m_pool via uniroot sur un intervalle raisonnable (à calibrer en fonction de la caractéristique de la contamination, exemple ci-dessous « interval = c(1.5, 2.3) »)

```
res <- uniroot(P_acc_pool_fun, interval = c(1.5, 2.3))
```

```
m_pool_equiv <- res$root
```

```
m_pool_equiv
```

Annexe 4 : Suivi des actualisations du rapport

Date	Page	Description de la modification
22/04/26	12	Tableau 2 : ajout « NR » ligne certification
22/04/26	14	Tableau 4 : ajout référence « AOAC PTMSM #070703 »
22/04/26	17	Ajout de la phrase « <i>Pour information, le LNR histamine recommande un prélèvement minimum de 50 g dans le cadre des analyses réglementaires avec la méthode ISO 19343:2017. Ceci permet de garantir l'homogénéité de la prise d'essai (5 g) tout en limitant l'impact de la quantité prélevée notamment lors de la vente au détail.</i> »
22/04/26	20	Changement de la date de validation du rapport : « 22/04/2026 »