

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 18 mai 2017

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

relatif à la détection des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière viande hachée bovine

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 17 mai 2016 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) d'une demande d'avis relatif à la détection des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière viande hachée bovine.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Les modalités actuelles de gestion du danger STEC mises en œuvre par la DGAL sont essentiellement fondées sur les avis de l'Anses relatifs à la saisine 2010-SA-0031 :

- du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis de l'Afssa du 15 juillet 2008,
- du 11 janvier 2011 relatif à la révision de la définition des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) majeurs typiques, à l'appréciation quantitative des risques liés à ces bactéries à différentes étapes de la chaîne alimentaire, selon les différents modes de consommation des steaks hachés, et à la prise en compte du danger lié aux *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) dans les aliments.

Depuis la publication de ces avis, des évolutions ont été observées, concernant notamment les procédures de maîtrise préventives mises en place par les opérateurs professionnels et les modalités de vérification (plan d'échantillonnage défini dans le cadre des autocontrôles). Les études et travaux se sont également poursuivis afin de compléter les connaissances scientifiques en la matière. L'avis de l'Anses n° 2013-SA-0223 du 6 mai 2014 relatif à la définition d'un plan d'échantillonnage pour la détection de *E. coli* O157:H7 dans le cadre des autocontrôles en filière viande hachée bovine différenciait trois niveaux de distribution des bactéries dans une mêlée : homogène, moyennement homogène et hétérogène. Afin de préciser le degré d'homogénéité des mêlées, une étude a été coordonnée par l'Institut de l'élevage (IDELE), permettant de caractériser le paramètre « b » relatif à la répartition de la contamination des souches de STEC dans une mêlée.

Enfin, des discussions ont été engagées fin 2013 par la Commission européenne, en vue de rédiger des lignes directrices pour harmoniser, au sein des Etats membres, les mesures de gestion mises en œuvre lors de la détection des STEC dans les aliments. Plusieurs propositions ont été discutées, mais aucune n'a permis d'aboutir du fait de l'absence de consensus sur le niveau de risque associé aux différents profils de souches STEC.

En vue d'une actualisation des mesures de gestion des STEC par la DGAL, l'Anses a été saisie des questions suivantes :

1°/ La définition des souches de STEC à considérer comme potentiellement hautement pathogènes de l'avis de l'Agence du 27 mai 2010 nécessite-t-elle d'être actualisée au vu des données épidémiologiques françaises, européennes et internationales récentes ?

2°/ L'avis de l'Agence du 11 janvier 2011 précise que, « dans le cas de l'isolement au laboratoire d'une souche AEEC¹ appartenant à un des 5 sérogroupes d'EHEC typiques majeurs dans un bouillon d'enrichissement dans lequel un gène *stx* a été détecté, il n'était pas possible dans l'état actuel des connaissances, de conclure quant à l'absence ou la présence dans l'aliment d'un STEC pouvant être hautement pathogène ». L'évolution des connaissances scientifiques sur les mécanismes d'acquisition et de perte des gènes *stx* chez *E. coli* et sur la caractérisation génétique et phénotypique des souches AEEC permet-elle aujourd'hui de préciser le risque associé à l'isolement de ces souches dans un aliment ?

3°/ Quelles sont les données disponibles relatives aux concentrations en STEC (ufc par g) dans les aliments et les eaux à l'origine des différentes épidémies survenues dans le monde ? Dans quelle mesure peuvent-elles être exploitées pour préciser les plans d'échantillonnage des viandes hachées bovines au regard de la maîtrise du risque épidémique ?

4°/ Sur la base des conclusions de l'étude IDELE sur l'homogénéité des mêlées :

- Un plan d'échantillonnage fondé sur l'analyse d'un échantillon de 25 g (n=1, m=absence dans 25g) est-il de nature à détecter une concentration en STEC de 1ufc/g de mêlée ?
- Un plan d'échantillonnage de type n=3, c=0, m= absence dans 25 g ou n=1, m= absence dans 75 g (avec une méthode d'analyse dont les performances pour cette prise d'essai seraient validées comme équivalentes à une prise d'essai de 25 g) peut-il être considéré comme permettant de détecter une concentration en STEC de 0,1 ufc/g dans une mêlée ?
- Quelle est la différence de niveau de risque entre une détection systématique dans 25 g (n=1, m=absence dans 25 g), et une détection systématique dans 75 g (n=3, c=0, m=absence dans 25 g ou n=1, m=absence dans 75 g) ?

5°/ Dans le contexte d'un établissement de production de viande hachée ayant un plan de maîtrise sanitaire jugé satisfaisant et qui réalise, à des fins de vérification de l'efficacité des mesures de maîtrise préventives mises en œuvre, un dépistage systématique de STEC (O157:H7 ou autre sérotype selon les méthodes analytiques utilisées) sur chaque mêlée, quel serait le niveau de risque estimé (prévention des cas groupés et épidémiques) si des mesures de gestion (pour le(s) sérotype(s) faisant l'objet d'une analyse systématique) étaient mises en œuvre uniquement sur les produits issus de la mêlée détectée positive, (sans action sur les mêlées encadrantes qui ont donné un résultat d'autocontrôle négatif, comme prévu aujourd'hui dans l'instruction technique DGAL/MUS/2015-888) ?

6°/ En prenant en compte la représentativité des données disponibles au niveau français et selon une approche intégrée et préventive de la maîtrise sanitaire, une stratégie incluant des contrôles sur matières premières serait-elle de nature à optimiser le rapport coût/efficacité des plans d'autocontrôles, qui, à ce jour, ne visent la plupart du temps que les produits finis ? Si oui, quels protocoles seraient adaptés (matrice, n, m, méthodes d'analyse) ?

¹ AEEC : "Attaching and effacing *E. coli*"

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisé (CES) « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » (BIORISK) sur la base d'un rapport initial rédigé par un groupe de rapporteurs. L'expertise s'est appuyée sur :

- les données épidémiologiques françaises et européennes ;
- les informations transmises par le LNR *E. coli* y compris les *E. coli* producteurs de shigatoxines sur la contamination des aliments par les STEC ;
- la littérature récente (cf. références bibliographiques) ;
- les informations transmises par les fédérations professionnelles (audition du 9 septembre 2016) et des fabricants (questionnaire) de la filière viande hachée bovine.

Le modèle développé par l'Anses dans le cadre de la saisine 2013-SA-0223 a été modifié afin de tenir compte des données et informations transmises par les professionnels et de l'évolution des connaissances scientifiques (en particulier l'étude de l'IDELE sur l'évaluation du degré d'homogénéité des mêlées de viandes hachées).

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Dans ce contexte, un expert n'a pas pris part aux travaux et délibérations sur cette saisine. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES BIORISK

3.1. Revue critique de la définition des EHEC typiques majeurs

3.1.1. Rappel des définitions et concepts sur la pathogénicité des EHEC

➤ EHEC /STEC

Sur la base des signes cliniques observés chez les malades, les souches de *E. coli* pathogènes sont regroupées en pathovars (ou pathotypes) parmi lesquels les **EHEC** (*enterohémorragic E. coli*).

Chez l'Homme, les EHEC sont responsables de troubles variés allant d'une diarrhée aqueuse bénigne à une colite hémorragique pouvant évoluer vers des formes graves : syndrome hémolytique et urémique (SHU), principalement chez le jeune enfant, ou micro-angiopathie thrombotique (MAT) chez l'adulte.

Les EHEC se caractérisent par la production des **shigatoxines** (Stx) (anciennement dénommées Vérotoxines Vtx), codées par les gènes **stx** portés par des bactériophages. Ces toxines entraînent la mort des cellules cibles par arrêt des synthèses protéiques et induisent des lésions de l'endothélium vasculaire, principalement intestinal, rénal et cérébral. Toute souche d'*E. coli* possédant un gène *stx* est dénommée **STEC** pour « *shigatoxin-producing E. coli* » (anciennement dénommée VTEC).

Deux grands types de shigatoxines, Stx1 et Stx2, et de nombreux variants ont été identifiés (Afssa 2008). Le type de variant refléterait à la fois l'origine des souches, leur phylogénie, mais aussi leur pouvoir pathogène. Les études épidémiologiques ont montré que Stx2 est plus souvent associée à une maladie plus grave chez l'Homme que Stx1.

La seule présence du gène *stx* ne suffit pas à déclencher une pathologie chez l'Homme. La majorité des souches d'EHEC induisent des lésions dites « d'attachement et d'effacement » des cellules de la muqueuse de l'iléon distal et du côlon, notamment par l'intermédiaire d'une protéine de membrane, l'**intimine**. Cette protéine est codée par le gène **eae** porté par le locus chromosomique d'effacement des entérocytes (LEE).

Plusieurs variants d'intimine (alpha, bêta, gamma,...) ont été identifiés ; ils seraient impliqués dans le tropisme cellulaire, la spécificité d'hôte et donc dans le pouvoir pathogène des EHEC (Afssa 2008).

D'autres souches d'EHEC ne possèdent pas le gène *eae* et ne produisent donc pas de lésion d'attachement et d'effacement. Ces souches possèdent donc d'autres facteurs d'adhésion permettant une colonisation de la muqueuse colique. A titre d'exemple, la souche O104:H4 responsable des épidémies en Allemagne et en France en 2011 se caractérise par la production de shigatoxine et la capacité à adhérer à la muqueuse intestinale avec un profil d'adhésion agrégative. Ce mécanisme d'adhésion, caractéristique des souches de *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC pour *Enteraggregative E. coli*) est dû à des fimbriae AAF dont l'expression est régulée par le gène *aggR*.

Un état des connaissances sur les mécanismes et les déterminants de la virulence des pathotypes d'*E. coli* et en particulier des EAEC a été récemment effectué par le panel BIOHAZ de l'EFSA (EFSA BIOHAZ Panel 2015).

➤ Définitions des avis de l'Afssa de 2008 et de 2010

L'analyse des données épidémiologiques montre que certains sérotypes d'EHEC isolés chez l'Homme sont plus fréquemment associés à une maladie grave.

Les souches les plus fréquemment impliquées dans les épidémies ont été définies par l'Agence comme souches « EHEC typiques majeures » selon les critères génétiques suivants :

EHEC O157:H7 = *rfbE*_{O157}, *flic*_{H7}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-gamma, (OI#122²).

EHEC O26:H11 = *wzx*_{O26}, *flic*_{H11}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-bêta, (OI#122).

EHEC O145:H28 = *ihp1*_{O145}, *flic*_{H28}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-gamma, (OI#122).

EHEC O103:H2 = *wzx*_{O103}, *flic*_{H2}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-epsilon, (OI#122).

EHEC O111:H8 = *wbd1*_{O111}, *flic*_{H8}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-thêta, (OI#122).

L'Agence soulignait dans son avis le caractère temporaire de la définition proposée. Celle-ci devra être révisée en fonction des nouvelles observations cliniques, des résultats d'investigations épidémiologiques, des résultats des projets de recherche et du développement de méthodes fines.

En outre, l'Agence soulignait que lors de l'examen bactériologique d'un aliment, réalisé en dehors d'un contexte clinique chez l'Homme, c'est bien la mise en évidence des différents facteurs ou marqueurs de virulence au sein d'une même souche qui permet d'estimer son caractère pathogène. En conséquence, l'Agence recommandait de considérer une souche comme :

- hautement pathogène quand elle présente les caractéristiques d'un EHEC typique majeur (possession des gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* et *eae* et appartenance à un des sérotypes suivants et leurs dérivés non mobiles : O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 et O111:H8),
- pathogène quand elle présente les caractéristiques d'un EHEC typique (possession des gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* et *eae*).

➤ Avis du panel BIOHAZ de l'EFSA relatif aux VTEC (STEC), au concept de sérotypotype et aux critères scientifiques permettant l'évaluation de leur pouvoir pathogène (EFSA BIOHAZ Panel 2013)

Cet avis propose une approche moléculaire pour l'évaluation du risque associé aux souches STEC isolées dans les aliments. En plus du gène *stx*, les gènes *eae*, *aaic* et *aggR* sont pris en considération. Trois groupes de risque sont considérés : I (risque potentiel élevé) à III (risque inconnu). Le groupe I inclut les 5 sérogroupe reconnus comme majeurs et O104. L'ajout des marqueurs *aaic* et *aggR* et du sérogroupe O104 est lié à l'épidémie causée par la souche hybride STEC/EAEC O104:H4 en 2011.

² Ilot de pathogénicité (« O Island ») contenant 4 gènes de virulence

L'Efsa souligne le caractère provisoire de cette classification qui doit être confirmée par des données épidémiologiques.

Tableau 1. Approche moléculaire proposée par le panel BIOHAZ de l'EFSA pour la classification des STEC (*stx*+) (EFSA BIOHAZ Panel 2013)

Groupe	Gènes	Sérogroupe	Risque potentiel	
			Diarrhée	SHU / Colite hémorragique
I	<i>eae</i> + ou (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>) +	O157, O26, O103, O145, O111, O104	Elevé	Elevé
II	<i>eae</i> + ou (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>) +	Tout autre sérotype	Elevé	Inconnu
III	<i>eae</i> – et (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>) –	Tout autre sérotype	Inconnu	Inconnu

L'approche retenue est d'adapter la classification de l'EFSA, en se fondant sur les données épidémiologiques françaises et européennes (2011-2015) et les données disponibles sur la contamination des réservoirs et des aliments par les EHEC.

3.1.2. Bilan des données épidémiologiques françaises et européennes (2011-2015)

➤ Données épidémiologiques françaises (données du CNR et de Santé publique France)

En France, la surveillance des infections à EHEC est basée depuis 1996 sur la surveillance des cas de SHU chez l'enfant de moins de 15 ans, par l'intermédiaire d'un réseau de services hospitalo-universitaires de néphrologie pédiatrique. Les cas de SHU sont notifiés à Santé publique France. Les souches sont adressées au Centre national de référence (CNR) des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* (Institut Pasteur) et son laboratoire associé (Hôpital Robert Debré) en cas de suspicion d'infection à EHEC chez l'enfant ou l'adulte. L'infection à EHEC est confirmée par le CNR à l'aide des techniques suivantes (Bruyand *et al.* 2016) :

- Sur selles ou écouvillonnage rectal :
 - Amplification génique *in situ* par PCR des gènes de virulence *stx* (*stx1*, *stx2*), *eae* et *hlyA*, et des gènes codant pour 10 des sérogroupe fréquents en France (O157, O121, O26, O103, O91, O145, O55, O111, O104 et O80) ;
 - Isolement des souches de STEC et caractérisation des facteurs de virulence (*stx*, *eae*, *hly*, *aggR*) et sérogroupage ;
- Dans le sérum : par mise en évidence d'anticorps sériques dirigés contre le lipo-polysaccharide de 9 sérogroupe (O26, O55, O91, O103, O104, O111, O128, O145, O157).

• Incidence du SHU chez les enfants de moins de 15 ans

Au cours de la période 2011 - 2015, 687 cas de SHU ont été notifiés (137 cas en moyenne par an). Depuis 1996, l'incidence annuelle du SHU varie entre 0,6 et 1,3 cas/100 000 enfants de moins de 15 ans. Ces cas surviennent essentiellement sous forme sporadique. L'incidence annuelle la plus élevée est observée chez les enfants de moins de 3 ans ; elle est de 3,1 cas /100 000 enfants en 2015 (Bruyand *et al.* 2016). Une recrudescence des cas est observée en période estivale.

• Caractéristiques microbiologiques des souches impliquées dans les cas de SHU

Une confirmation microbiologique ou sérologique d'infection à EHEC a pu être réalisée pour environ 80% des cas de SHU pédiatriques notifiés en France entre 2011 et 2015.

Le tableau 2 présente la répartition des sérogroupe d'EHEC impliqués dans les cas de SHU pédiatriques entre 2011 et 2015. Une diminution de la proportion du sérogroupe O157 au profit d'autres sérogroupe est observée (de 34% en 2011 à 17% en 2015). Le sérogroupe O26 constitue le deuxième sérogroupe isolé.

Le sérotype O80 a émergé en France en 2010, et représente le troisième sérotype en fréquence. En 2015, le sérotype O80 était le sérotype majoritairement isolé dans les selles des patients atteints de SHU (33%) suivi par les sérotypes O157 (24%) et O26 (14%). La prévalence du sérotype O104, responsable de l'épidémie allemande et française en 2011, a nettement diminué et n'est retrouvé que dans quelques cas sporadiques.

Tableau 2. Sérotypes les plus fréquemment isolés dans les cas de SHU en France entre 2011 et 2015

Sérotype	2011		2012		2013		2014		2015	
	Nombre de Cas	%	Nombre de Cas	%	Nombre de Cas	%	Nombre de Cas	%	Nombre de Cas	%
O157	56	34,6	50	34,5	48	31,6	37	31,6	19	17,1
O26	7	4,3	13	9	21	13,8	10	8,5	16	14,4
O80	0	0	6	4,1	10	6,6	10	8,5	15	13,5
O121	2	1,2	10	6,9	7	4,6	4	3,4	2	1,8
O103	5	3,1	0	0	1	0,7	2	1,7	2	1,8
O91	1	0,6	2	1,4	0	0	1	0,9	0	0
O145	5	3,1	5	3,4	0	0	2	1,7	3	2,7
O111	2	1,2	7	4,8	7	4,6	2	1,7	4	3,6
O104	4	2,5	0	0	3	2	0	0	1	0,9
O55	0	0	2	1,4	0	0	6	5,1	4	3,6

Au cours de la période de 2011 à 2015, le CNR et le laboratoire associé ont isolé 910 souches d'EHEC. Le profil de virulence le plus souvent retrouvé parmi les souches EHEC est le profil associant les gènes *stx2 eae hlyA* (44,2% des souches). S'agissant des souches responsables de SHU, 95% des souches isolées entre 2011 et 2015 possédaient le gène de virulence *stx2* (seul ou en association avec *stx1*) et 85 % des souches isolées possédaient les gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* et *eae*. (cf. tableau 3)

Tableau 3. Profil de virulence des souches d'EHEC isolées dans les cas de SHU en France entre 2011 et 2015 (extraction de la base de données TESSY de l'ECDC)

Profil de virulence	Proportion des souches				
	2011	2012	2013	2014	2015
<i>stx1</i> -, <i>stx2</i> +, <i>eae</i> +	65	68	71	76	78
<i>stx1</i> -, <i>stx2</i> +, <i>eae</i> -	21	11	15	12	14
<i>stx1</i> +, <i>stx2</i> +, <i>eae</i> +	8	15	11	7	5
<i>stx1</i> +, <i>stx2</i> -, <i>eae</i> +	3	4	1	2	4
<i>stx1</i> -, <i>stx2</i> -, <i>eae</i> +	2	1	2	0	0
<i>stx1</i> +, <i>stx2</i> -, <i>eae</i> -	1	0	1	1	0
<i>stx1</i> +, <i>stx2</i> +, <i>eae</i> -	1	0	0	0	0

- Focus sur l'émergence du sérotype O80:H2

Les *E. coli* de sérotype O80:H2, pathotype émergent en France depuis une dizaine d'années, possèdent plusieurs particularités. Il s'agit d'un pathotype « hybride » possédant les caractéristiques des EHEC mais aussi des facteurs de virulence des *E. coli* extra-intestinaux avec retentissement clinique (bactériémie). De ce fait, l'attitude thérapeutique préconisée lors d'un cas de SHU est remise en cause (Soysal *et al.* 2016).

La caractérisation moléculaire de ce sérotype, affilié au groupe phylogénétique A, a mis en évidence qu'en plus des attributs des souches d'EHEC (*stx2*, *eae*, *hlyA*), il possède un plasmide de virulence extra-intestinal. Ce plasmide est similaire à pS88, un plasmide ColV impliqué dans la virulence de souche de bactériémie et de méningite néonatale (Soysal *et al.* 2016)

Le sérotype O80:H2 possède une répartition géographique particulière, avec une nette prédominance en Rhône-Alpes, région française épargnée par le sérotype majeur O157.

D'après les connaissances actuelles, ce sérotype a été peu retrouvé dans d'autres pays européens (quelques souches en Espagne et en Suisse). Des investigations sont actuellement menées pour identifier la source de sérotype (investigation des cas sporadiques, recherche dans le cadre des plans de surveillance).

- Epidémies et cas groupés recensés

Entre 2011 et 2015, quatre épidémies d'origine alimentaire ont été détectées en France par le système de surveillance (cf. tableau 4).

Tableau 4. Epidémies d'infections à EHEC d'origine alimentaires identifiées en France entre 2011 et 2015

Année	Région	Sérogroupe / sérotype Profil virulence	Nombre de cas (dont SHU)	Source
2011	Bordeaux	O104:H4 <i>stx2 aggR</i>	15 (9)	Germes de fenugrec
	Nord de la France	O157:H7 sorbitol+ <i>stx2 eae hlyA</i>	18 (18)	Viande hachée de bœuf
2012	Sud-Ouest	O157:H7 <i>stx2 eae hlyA</i>	6 (4)	Steak haché de bœuf
2013	Ouest	O157 : H- <i>stx2 eae hlyA</i>	8 (5)	Fromage au lait cru

En plus des épidémies, 51 foyers de cas groupés à EHEC ont été identifiés au cours de la période. Un foyer de cas groupés est défini par Santé publique France comme l'identification d'une infection à EHEC par analyse de selles ou sérologie chez au moins une personne (avec ou sans symptômes cliniques) dans l'entourage d'un cas de SHU. Ces cas groupés surviennent essentiellement dans le cadre familial.

➤ **Données épidémiologiques européennes**

La surveillance européenne des infections à EHEC est coordonnée par l'ECDC (European Centre for Disease Control) depuis 2007. Les États membres de l'Espace économique européen (l'Union européenne (UE), la Norvège, l'Islande et la Suisse) transmettent chaque année des données sur les infections à EHEC identifiées dans leur pays.

Les infections aux EHEC sont à déclaration obligatoire dans la majorité des pays de l'UE, en Islande et en Norvège. Dans six pays, la notification des infections repose sur un réseau de surveillance volontaire (Belgique, France, Italie, Luxembourg, Espagne) ou un système spécifique (Royaume-Uni). La couverture de surveillance est nationale dans la majorité des pays à l'exception de la France et la Belgique.

Depuis 2012, une augmentation de l'incidence des infections à EHEC est observée dans plusieurs pays de l'UE. Le tableau 5 présente les 10 principaux sérogroupe impliqués dans les cas d'infections à EHEC entre 2012 et 2015.

Le sérogroupe O157 reste prédominant dans les infections à EHEC déclarées en Europe entre 2012 et 2015, même si une diminution de leur proportion est observée. Ce sérogroupe représente 42% des infections humaines confirmées en 2015 contre 55% en 2012 (EFSA et ECDC 2015b, 2016). O26 représente le deuxième sérogroupe isolé en Europe (15% en 2015).

Les sérogroupe O157, O26, O103, O111 et O145 représentent 70% des infections humaines à EHEC identifiées à l'échelon européen pendant la période 2012-2015 (EFSA et ECDC 2015b, 2016). Entre 2012 et 2015, seuls 30 cas d'infections liés au sérogroupe O104 ont été déclarés en Europe (dont 6 liés au sérotype O104:H4) (EFSA et ECDC 2015b, a, 2016).

Tableau 5. Sérogroupes les plus fréquemment isolés dans les cas d'infections à EHEC entre 2012 et 2015 en Europe (EFSA et ECDC 2015a, 2016)

Séro groupe	2012		2013		2014		2015	
	Nombre de Cas	%	Nombre de Cas	%	Nombre de Cas	%	Nombre de Cas	%
O157	1981	54,9	1828	48,9	1692	46,3	1510	41,7
O26	417	11,6	476	12,7	444	12,2	537	14,8
NST ¹	136	3,8	298	8	315	8,6	430	11,9
O103	231	6,4	160	4,3	193	5,3	171	4,7
O91	131	3,6	94	2,5	105	2,9	114	3,1
O145	112	3,1	96	2,6	105	2,9	95	2,6
O146	59	1,6	75	2	83	2,3	74	2
O128	37	1	41	1,1	47	1,3	49	1,4
O-rough ²	37	1	41	1,1	55	1,5	45	1,2
O111	66	1,8	78	2,1	54	1,5	12	1,2

¹ NST : non sérotypable

² O-rough : les souches O-rough ne possèdent pas les chaînes O du lipopolysaccharide

3.1.3. Contamination des réservoirs animaux et des aliments par les EHEC

➤ Prévalence dans le réservoir animal

La prévalence globale des bovins adultes excréteurs d'EHEC appartenant aux cinq sérotypes (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 ou O111:H8) a été estimée en France à 1,8% : 4,5% des jeunes bovins laitiers, 2,4% des jeunes bovins à viande, 1,8% des vaches laitières, 1% des vaches à viande (Bibbal *et al.* 2015). La recherche de marqueurs génétiques caractéristiques de la souche épidémique O104:H4 dans les fèces de 1468 bovins n'a pas permis d'identifier d'animaux porteurs de cette souche, suggérant que le cheptel bovin français n'est pas un réservoir de ce type de souche (Auvray *et al.* 2012). De même, cette souche n'a pu être mise en évidence chez les bovins lors de la réalisation de différentes études dans d'autres pays, par exemple en Allemagne, en Espagne et aux États-Unis (Cabal *et al.* 2015, Paddock *et al.* 2013, Shridhar *et al.* 2016, Wieler *et al.* 2011).

➤ Prévalence des souches isolées dans les aliments en France

Depuis 2005, des plans de surveillance (PS) sont mis en place annuellement par la DGAL sur les produits suivants :

- les viandes hachées de bœuf surgelées (VHS) à la production (2007, 2011, 2012, 2013) ;
- les viandes hachées de bœuf réfrigérées (VHR) à la distribution (2006, 2009, 2015, 2015) ;
- les minerais (viande pour haché) de bœuf (2008, 2013) ;
- les fromages au lait cru à la production (2005; 2007,2009, 2014).

Les souches recherchées sont :

- les souches possédant les gènes de virulence *stx* (*stx1* et/ou *stx2*) et *eae* et appartenant à l'un des cinq sérotypes O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 ou O111:H8 (souches dites du « top 5 »),
- et depuis 2012, pour les viandes hachées bovines uniquement, les souches possédant les gènes de virulence *stx* (*stx1* et/ou *stx2*) et *eae* et appartenant soit au sérotype O45, soit au sérotype O121, ciblées par la réglementation américaine.

Les résultats des PS (Cf. Annexe 2) montrent une prévalence de contamination faible dans les viandes hachées (entre 0,3 et 0,5%) et les fromages au lait cru (inférieure à 0,9%) (Loukiadis *et al.* 2012, Loukiadis, Mazuy-Cruchaudet, et Ferre 2012, Loukiadis et Mazuy-Cruchaudet 2013, 2014, Sergentet, Mazuy-Cruchaudet, et Ruez 2015, Loukiadis, Mazuy-Cruchaudet, *et al.* 2017). Parmi les 57 souches du « top 5 » isolées dans les viandes de bœuf dans le cadre des PS, 40% appartiennent au sérotype O157:H7. Les

sérotypes les plus fréquemment retrouvés sont ensuite, par ordre d'importance O26:H11 (28%), O103:H2 (25%), O145:H28 (2%) et O111:H8 (2%). Aucune souche des sérotypes O45 ou O121 n'a été retrouvée dans la viande bovine en France. La majorité des souches isolées dans les fromages au lait cru appartiennent au sérotype O26:H11 (68%).

➤ **Caractéristiques génétiques des souches isolées des aliments en France**

Un projet de recherche réalisé dans le cadre d'une convention entre l'Anses, VetAgro Sup et l'hôpital Robert Debré, avait pour objectif d'établir un bilan national des caractéristiques des souches STEC isolées entre 2011 et 2012 chez l'Homme, dans les aliments, chez l'animal et dans l'environnement (Mariani-Kurkdjian *et al.* 2014).

Une collection de 270 souches d'origine humaine et non humaines représentatives des souches circulant en France a été caractérisée génétiquement (recherche de marqueurs de virulence, typage par PFGE, MLST et MLVA) et phénotypiquement (antibiorésistance en particulier l'étude de la concentration minimale inhibitrice de l'azythromicine). Cette étude avait mis en évidence une grande diversité des souches circulant en France entre 2011 et 2012. Toutes les souches étudiées étaient sensibles à l'azythromicine qui est le traitement recommandé par le Haut conseil de santé publique au cours des diarrhées à EHEC dans les collectivités.

L'analyse comparée des profils de virulence des souches d'origine humaine et alimentaire ne montre pas de différence significative, ce qui confirme que les souches présentes dans les aliments peuvent être pathogènes pour l'Homme.

Les résultats obtenus confirment que les souches EHEC O157:H7, quelle que soit leur origine, possèdent un plus grand nombre de gènes de virulence que les autres souches appartenant aux sérotypes les plus fréquemment impliqués dans les épidémies (O26:H11, O103:H2, O145:H28, O111:H8, O121:H19). Les souches appartenant à d'autres sérotypes, moins fréquents, possèdent significativement moins de gènes de virulence que les précédentes.

Conclusion

L'analyse des données épidémiologiques françaises et européennes met en évidence les points suivants :

- Le sérotype O157 reste majoritaire dans les cas d'infections déclarées en Europe, mais sa proportion diminue, et particulièrement en France (de 34% en 2011 à 17% en 2015) ;
- On note l'émergence, en France uniquement, du sérotype O80:H2, qui représente le troisième sérotype isolé en 2015. Ce sérotype, retrouvé dans les SHU de l'enfant, présente une virulence hybride à la fois intestinale et extra-intestinale ;
- La grande majorité des souches d'EHEC isolées dans les cas de SHU présentent les caractéristiques de virulence décrites dans les avis précédents de l'Agence (*stx1* et/ou *stx2*, *eae*). Les profils de virulence des souches d'origine humaine et des souches alimentaires sont similaires ;
- Depuis 2012, le sérotype O104 est resté minoritaire dans les cas de SHU déclarés en Europe (30 cas entre 2012 et 2015). Par ailleurs, la souche O104:H4, responsable de l'épidémie allemande et française en 2011, n'a pas été mise en évidence dans le réservoir bovin en France ni dans d'autres pays.

Toute souche d'*E. coli* isolée chez l'Homme ou dans les aliments devrait être considérée comme une EHEC, si elle possède les gènes de virulence suivants :

- *stx1* et/ou *stx2*
- *eae* ou d'autre(s) gène(s) codant un système d'adhésion au tube digestif de l'Homme.

Certains sérotypes d'EHEC sont plus fréquemment associés à une maladie grave (SHU). Au vu des données épidémiologiques françaises, il est proposé d'inclure le sérotype O80 dans le groupe I des EHEC à risque élevé (Tableau 6).

Le CES BIORISK souligne toutefois que la source de contamination de la souche O80:H2 devrait être identifiée avant toute introduction de ce sérotype dans la liste des souches d'EHEC à rechercher dans le cadre des autocontrôles. De même, au regard des données disponibles sur la contamination du réservoir bovin, la recherche du sérotype O104 :H4 dans les produits d'origine bovine ne paraît pas pertinente.

Tableau 6. Classification des souches *stx+* selon leur risque pour la santé publique en France

Groupe	Gènes	Sérotypes	Risque	
			Diarrhée	SHU / Colite hémorragique
I	<i>stx+ eae +</i> ou (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>) ⁺	O157, O26, O103, O145, O111, O104, O80	élevé	élevé
II	<i>stx +eae +</i> ou (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>) ⁺	tout autre sérotype	élevé	potentiel
III	<i>stx + eae-</i> et (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>) ⁻	tout autre sérotype	potentiel	potentiel

3.2. Évaluation du pouvoir pathogène des souches *stx*-*eae*⁺ appartenant à l'un des sérotypes majeurs et isolées d'un bouillon de culture positif pour *stx*

3.2.1. Contexte

Les gènes *stx* sont portés par des éléments mobiles, des bactériophages tempérés ayant leur génome inséré (on parle de « prophage Stx ») dans le chromosome des EHEC (avis de l'Anses n°2010-SA-0031). Du fait de la présence d'un prophage Stx dans leur chromosome, les EHEC sont qualifiés de bactéries « lysogènes ». En présence de certains stress ou d'un agent inducteur comme la mitomycine C, une induction du prophage Stx peut se produire, ce qui déclenche un cycle lytique (Figure 1 ; étapes 1 à 4). Au cours de ce cycle, le génome du prophage s'excise du chromosome bactérien et se multiplie (réplication). De nouvelles particules phagiques sont ensuite produites, puis libérées dans le milieu extérieur grâce à la lyse de la bactérie. Ces phages peuvent infecter de nouvelles bactéries, et les rendre lysogènes via l'insertion de l'ADN phagique dans le chromosome bactérien, on parle alors de cycle lysogénique (Figure 1 ; étapes 5 à 8).

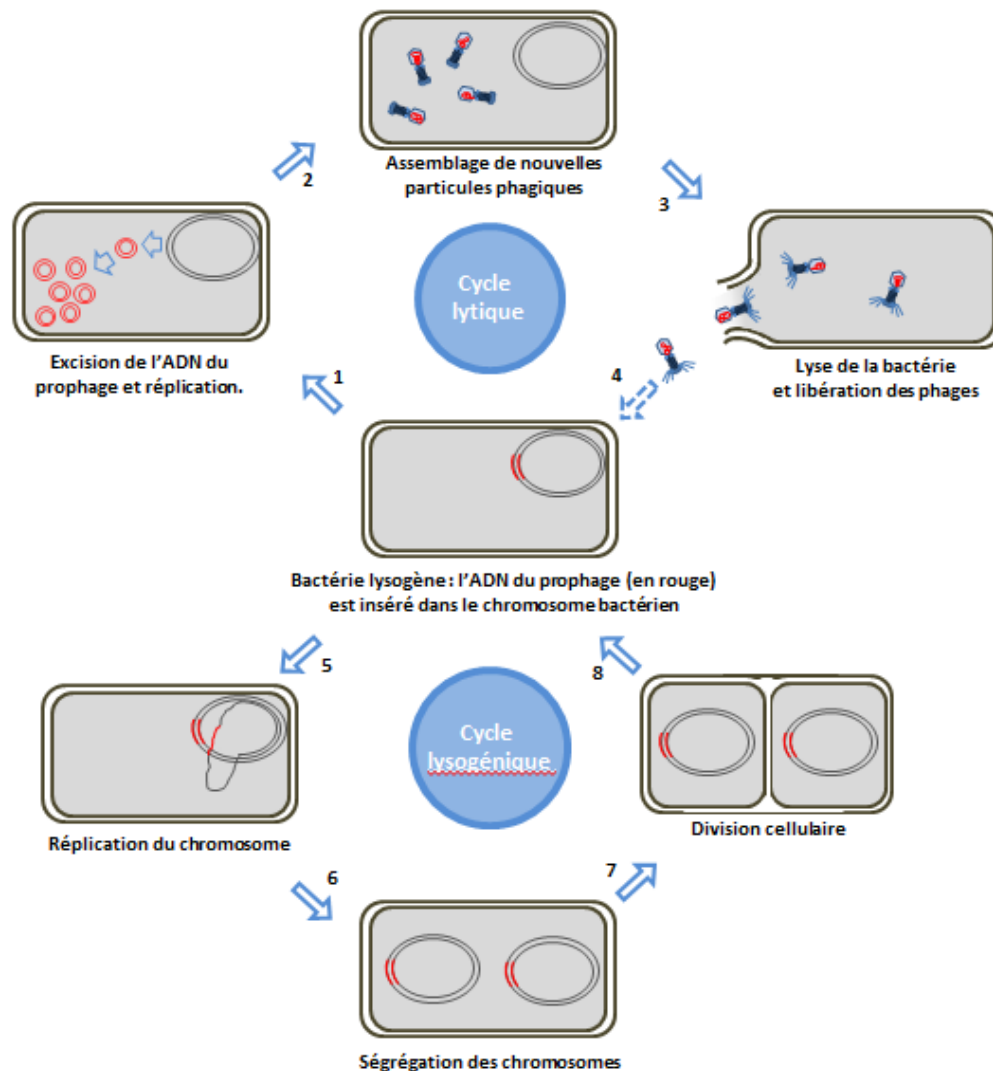


Figure 1. Schéma des cycles lytique et lysogénique des bactériophages tempérés (adapté de (Bonanno 2016))

Il a été montré que des souches d'*E. coli*, présentant toutes les caractéristiques génétiques des EHEC à l'exception des gènes *stx*, pouvaient être isolées de bovins, de l'Homme et de produits alimentaires. De telles souches *stx*-*eae*+ sont des EPEC³ (*E. coli* entéropathogènes).

La mise en œuvre de la méthode de recherche des EHEC dans les aliments lors d'analyses officielles conduit parfois à l'isolement de souches *stx*-*eae*+ à partir d'un bouillon d'enrichissement d'un aliment dans lequel un gène *stx* a été détecté par PCR. Ces souches pourraient être le témoin de la présence d'un EHEC dans l'aliment, dont elles dériveraient après la perte de leur prophage *Stx*, soit dans l'aliment, soit durant leur isolement.

L'Anses dans son avis du 11 janvier 2011 indiquait qu'il n'était pas possible de conclure dans l'état actuel des connaissances sur l'absence ou la présence d'un EHEC dans l'aliment. L'Agence recommandait l'acquisition de connaissances scientifiques supplémentaires concernant les mécanismes d'acquisition et de perte des gènes *stx* chez *E. coli* et la caractérisation génétique et phénotypique de ces souches.

3.2.2. Actualisation des connaissances

Le mécanisme de la transformation d'un EHEC en EPEC via une perte du prophage *Stx* demeure très mal connu. Il est probable que lors du déclenchement d'un cycle lytique, certaines cellules bactériennes initient un cycle lytique partiel qui avorte avant l'étape de lyse, par exemple après l'étape d'excision de l'ADN phagique (Figure 1, étape 1), conduisant, au moment de la division cellulaire, à l'obtention de cellules sans prophage *Stx*, qualifiées de « *stx*-négatives ».

Sur le plan génétique, on ne peut pas distinguer les souches EPEC dérivant d'EHEC (via une perte de prophages *Stx*) de souches EPEC ne dérivant pas d'EHEC. C'est ce que montrent les résultats d'une étude française, au cours de laquelle 123 souches d'*E. coli* O26, d'origine humaine et alimentaire, comprenant des souches *stx*-positives (n= 66) et *stx*-négatives (n=57), ont été comparées au niveau génétique par différentes méthodes, notamment par PCR à haut débit, MLVA et PFGE (et séquençage génomique pour 12 d'entre-elles) (Neto *et al.* 2012). Si deux grandes catégories de souches ont été identifiées sur le plan génétique, on retrouve à la fois des souches *stx*-positives et des souches *stx*-négatives dans chacune des catégories, par conséquent sans possibilité de distinguer ces deux types de souches par des marqueurs génétiques.

- Cycle lytique

Concernant l'induction des prophages *Stx*, il a été montré depuis la parution de l'avis de l'Anses du 11 janvier 2011 que les prophages *Stx* ont une capacité d'induction « spontanée » (c'est-à-dire en l'absence d'agent inducteur) plus élevée que celle des prophages lambdaïdes classiques (dépourvus de gènes *stx*), et que la différence de stabilité des prophages *Stx* et des prophages lambdaïdes classiques au sein du chromosome bactérien résulte de variations de la concentration intracellulaire du répresseur phagique, nommé *cl*, impliqué dans la commutation entre les cycles lysogénique et lytique (Colon *et al.* 2016). Par ailleurs, en présence d'un agent inducteur, une fraction de la population de STEC ne déclenche pas de cycle lytique et échappe ainsi à la lyse bactérienne, ce qui permet la survie de la population de STEC (Imamovic *et al.* 2016). Ce phénomène est lié à une modulation de l'induction des prophages *Stx* par la protéine RpoS, qualifiée de « régulateur maître » de la réponse au stress (Imamovic *et al.* 2016).

D'autres travaux ont confirmé que les prophages *Stx* de souches STEC O26:H11 étaient inductibles *in vitro* dans un bouillon de culture (i) en présence d'un agent inducteur (mitomycine C), avec lyse concomitante de la majorité des cellules bactériennes, mais également (ii) en l'absence d'agent inducteur (c'est-à-dire de manière spontanée), à un taux cependant moins élevé, c'est-à-dire n'entraînant pas la lyse de la majorité des cellules de la population (Bonanno *et al.* 2015, Bonanno, Petit, *et al.* 2016). L'étape d'enrichissement de la méthode de détection des STEC est également en mesure d'induire des prophages *Stx* à partir de souches STEC O26:H11, néanmoins sans entraîner la lyse de la majorité des cellules de la population (Bonanno 2016, Bonanno, Cherchame, *et al.* 2016). On notera toutefois que lorsque les substances sélectives utilisées au sein de cette étape ont été testées individuellement vis-à-vis de l'induction des prophages *Stx*, aucune n'a pu être identifiée comme étant à l'origine de ce phénomène (Bonanno *et al.* 2017).

³ Ces souches étaient appelées « AECC » dans l'avis de l'Anses n°2010-SA-0031.

Lorsque différents milieux d'enrichissement issus de la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136 et de méthodes alternatives ont été testés pour leur capacité à induire des prophages Stx à partir d'échantillons de lait et de fromage contaminés artificiellement avec des EHEC appartenant aux cinq sérotypes majeurs, une induction des prophages Stx a été mise en évidence, et ceci quelle que soit la méthode d'enrichissement utilisée (Bonanno, Cherchame, *et al.* 2016). Toutefois, si le phénomène d'induction des prophages Stx de STEC O26:H11 a pu être observé *in vitro*, celui-ci ne semble pas conduire à une production élevée de souches EPEC (*stx*-négatives) O26:H11 car de telles souches n'ont pas pu être isolées *in vitro* dans les conditions testées, malgré de multiples tentatives (Bonanno 2016).

L'évaluation de l'influence de certains paramètres physico-chimiques liés aux procédés de fabrication des fromages (tels que la température et la concentration en peroxyde d'hydrogène, en sel et en acide lactique) sur l'induction des prophages Stx de STEC O26:H11 a permis de mettre en évidence une induction de ces prophages en présence d'H₂O₂ et de NaCl, à des taux n'entraînant pas toutefois de lyse de la majorité des cellules de la population (Bonanno *et al.* 2017). La production de phages Stx dans des fromages au cours d'un procédé de fabrication réalisé à partir de lait inoculé par des STEC O26:H11 a également été mise évidence pour 20% des échantillons testés (10 sur 48) (Bonanno *et al.* 2017).

- Cycle lysogénique

Concernant l'acquisition de prophages Stx par des souches EPEC O26:H11 (appelé processus de lysogénéisation), celui-ci n'a pu être observé *in vitro* (Bonanno, Petit, *et al.* 2016). Ce résultat est en accord avec d'autres tentatives de lysogénéisation (dont certaines réalisées à partir de souches O26:H11) ayant montré que ce phénomène n'était pas systématique (Bielaszewska *et al.* 2007, Schmidt, Bielaszewska, et Karch 1999). Par ailleurs, des difficultés d'obtention de souches lysogènes stables ont également été rapportées dans d'autres études réalisées à partir de diverses souches d'*E. coli* (*E. coli* O157:H7 *stx*-négatif, EPEC et EAEC) (Muniesa *et al.* 2004, Tozzoli *et al.* 2014). On notera cependant que l'acquisition de prophages Stx par des souches de *E. coli* commensales a été démontrée *in vitro et in vivo*, et que la contribution de ce phénomène à une augmentation de la production de shigatoxine *in vivo* n'est pas exclue (Toth *et al.* 2003, Goswami *et al.* 2015, Iversen *et al.* 2015).

Conclusion

L'induction de prophages Stx à l'origine d'une production de particules phagiques et de la lyse d'une partie de la population d'EHEC est possible *in vitro* dans des bouillons d'enrichissement et dans des matrices alimentaires. Toutefois, la transformation d'EHEC en EPEC au cours de ce phénomène d'induction serait un événement rare qui demeure encore mal connu à l'heure actuelle. L'acquisition d'un prophage *stx* par un *E. coli* (qui conduirait à l'obtention d'un EHEC) semble également constituer un événement rare ou qui n'aboutit pas au maintien stable du génome phagique dans le chromosome bactérien.

Sans confirmation par l'isolement de la souche, l'obtention d'un bouillon positif pour *stx* et un des types d'intimine (*eae*) des 5 principaux sérotypes d'EHEC, est le signe de la présence potentielle d'un EHEC. Si la souche isolée est *stx*-, elle ne peut pas être considérée comme une EHEC. Néanmoins, l'interprétation des résultats doit tenir compte du contexte épidémiologique dans lequel le prélèvement a été effectué ainsi que de la sensibilité et de la spécificité des méthodes analytiques utilisées.

3.3. Revue de la littérature sur des épidémies récentes avec données de quantification dans les aliments et vérification de la cohérence avec la relation dose-réponse

Les épidémies d'origine alimentaire associées aux EHEC (notamment de sérotype O157:H7) peuvent impliquer une grande variété de produits. Par le passé, les produits à base de viande bovine, des produits végétaux, ainsi que des produits laitiers (Farrokh *et al.* 2013, Callejón *et al.* 2015, CDC 2016) ont été impliqués. La viande de bœuf hachée semble plus particulièrement concernée. À titre d'exemple sur la période 1998-2014, plus de 100 épidémies ont été signalées aux USA (CDC 2016).

Malgré le grand nombre de foyers d'infection, il semble que peu d'études aient porté sur la quantification des EHEC dans les aliments impliqués. Ces données sont pourtant utiles pour estimer la relation dose-réponse, fournir les données aux modèles d'appréciation quantitative des risques et mesurer la performance des plans d'échantillonnage.

Cette synthèse vise à faire le point sur les données concernant les niveaux de contamination dans les produits alimentaires à l'origine d'épidémies (en particulier les produits à base de viande de bœuf) et vérifier si ces données permettent d'apporter des éléments de réponse à la question relative aux niveaux de contamination « entraînant un risque épidémique ».

3.3.1. Niveaux de contamination dans les produits à l'origine d'épidémies

Le tableau 7 rapporte les données relatives aux niveaux de contamination des viandes impliquées dans des épidémies associées à *E. coli* O157. Les dénombrements dans les produits crus (avant la cuisson) ne renseignent pas sur les doses ingérées par les consommateurs.

Certaines de ces épidémies ont servi à construire les différentes relations dose-réponse actuellement disponibles dans la littérature. Dans ces cas, les investigations menées lors des épidémies ont également permis d'estimer la dose ingérée par les consommateurs (en intégrant la quantité d'aliment ingéré et l'effet des pratiques de préparation des viandes).

Tableau 7. Niveaux de contamination dans des aliments à base de viande de bœuf impliqués dans des épidémies

	Aliment	Caractéristique d' <i>E. coli</i> pathogène	Pays	Année	Niveaux	Echantillons	Nombre de cas/Nombre d'exposés	Référence
1	Steak haché de bœuf	O157	USA	1992-93	1,5 NPP/g (0,3 – 15 NPP/g)	76 steaks issus du même lot (avant cuisson)	398/5634	(Tuttle <i>et al.</i> 1999, Strachan <i>et al.</i> 2005)
2	Steak haché surgelé	O157:H7, <i>stx1</i> , <i>stx2</i>	Japon	2004	1,45 NPP/g	Steaks issus du même lot cuits de façon similaire à celle des consommateurs	3/6	(Hara-Kudo et Takatori 2011)
3	Viande bœuf	O157:H7, <i>stx2</i>	Japon	2004	23 NPP/g	Steak(s) du même lot	-/-	
4	Foie de bœuf cru	O157:H7, <i>stx2</i>	Japon	2006	0,04 à 0,18 ufc/g	Reste du foie conservé au freezer	3/3	
5	Steak haché surgelé	O157:H7	France	2007	5,9 ufc/g	22 steaks issus du même lot (avant cuisson)	16/2155	(Delignette-Muller et Cornu 2008)
6	Steak haché surgelé assaisonné à l'ail et au poivre	O157 <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i>	Canada	2012	3,1 à 11,5 NPP/140 g de steak	12 steaks du même lot	8 cas/-	(Gill et Huszczyński 2016)

- Non rapporté

Ces produits présentent des niveaux de contamination nettement différents. La figure 2 présente les niveaux de contamination dans les viandes hachées de bœuf avant cuisson.

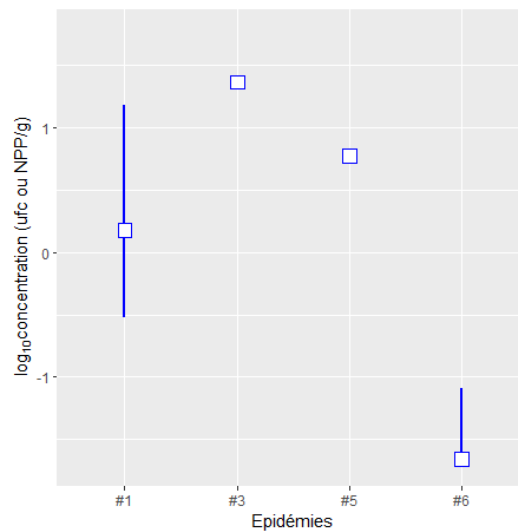


Figure 2. Concentrations en *E. coli* O157 dans des viandes hachées crues impliquées dans différentes épidémies (cf. Tableau 7 pour le descriptif des épidémies). (□) médiane (|) étendue des niveaux de contamination.

Les concentrations en EHEC (principalement O157) ont été caractérisées pour d'autres catégories d'aliments impliqués dans des épidémies (Tableau 8) : autres produits à base de viande, végétaux et produits laitiers. Les niveaux de contamination sont également très variables de 0,3 ufc/g jusqu'à près de 100 ufc/g (Tableau 8). Certaines des données concernant ces aliments ont été utilisées avec celles issues des épidémies impliquant la viande de bœuf pour la construction des relations dose-réponse. Les épidémies les plus récentes ne permettent pas de confirmer les relations dose-réponse existantes, le nombre de personnes exposées dans ces épidémies n'étant pas clairement connu.

Tableau 8. Niveaux de contamination dans divers aliments d'origine animale impliqués dans des épidémies

Aliment	Caractéristique d' <i>E. coli</i> pathogène	Pays	Année	Niveaux	Echantillons	Nombre de cas/Nombre d'exposés	Référence
Salami	O157	USA	1994	0,3-0,4 ufc/g	Autres paquets du lot	17/2778	(Strachan <i>et al.</i> 2005, Teunis, Ogden, et Strachan 2008)
Viande de cerf séchée	O157	USA	1995	3-93 ufc/g	Reste	10/12	
Salade et sauce de poisson	O157	Japon	1996	4-18 cfu/100 g	Echantillons du repas	Coproculture 208/828 chez les enfants 7/43 chez les adultes 32/71 (adultes et enfants)	
Melon	O157	Japon	1997	43 ufc/g	Echantillons du repas	32/71 (adultes et enfants)	
Fromage	O157	Grande-Bretagne	1997	5-10 ufc/g	-	2/360	
Crème glacée	O145:H28, O26:H11	Belgique	2007	2,4 ufc/g, 0,03 ufc/g	Glace du même lot	1/8, 2/11, 2/?	(Buvens <i>et al.</i> 2011)
Gouda	O157:H7	Canada	2013	1-10 NPP/g (entreprise A) 0,4-4 NPP/g (entreprise B)	Gouda analysé plusieurs semaines après la consommation (niveaux au moment de la consommation estimés)	29/?	(Gill et Oudit 2015)

3.3.2. Bilan des relations dose-réponse

L'objectif d'une relation dose-réponse est d'établir un lien entre le niveau d'une exposition microbienne (dose totale ingérée de microorganismes) et la probabilité de survenue d'un effet. On peut s'intéresser à différents effets : infection, maladie et décès. La plupart des modèles dose-réponse publiés sont mécanistiques et reposent sur deux hypothèses biologiques (Jaloustre 2011) : (1) l'absence de seuil, c'est-à-dire d'un nombre minimum de cellules de l'agent pathogène en dessous duquel aucun effet néfaste n'est observé ; (2) la dose minimale infectieuse (DMI). Deux raisons ont conduit à préférer les modèles sans seuil : (i) la contradiction, pour certaines épidémies entre les faibles doses ingérées et les DMI classiquement avancées et (ii) l'hypothèse, soutenue par la compréhension des mécanismes infectieux, selon laquelle une seule cellule peut suffire à infecter un hôte grâce à ses capacités de multiplication.

Plusieurs relations dose-réponse sont disponibles (Strachan *et al.* 2005, Teunis, Ogden, et Strachan 2008, Delignette-Muller et Cornu 2008, Perrin *et al.* 2015). Elles ont toutes été établies à partir de données collectées pour le sérotype O157. Ces relations se distinguent par la nature des effets prédits : probabilité d'infection pour deux des modèles (Strachan *et al.* 2005, Teunis, Ogden, et Strachan 2008), probabilité de syndrome hémolytique et urémique pour les deux autres (Delignette-Muller et Cornu 2008, Perrin *et al.* 2015).

Ces deux derniers modèles se distinguent également par l'introduction de la sensibilité des populations dans le calcul de la probabilité de l'effet. Ils reposent sur les données de la même épidémie. Le premier modèle propose de séparer les enfants en deux catégories distinctes ([0,5 ans] et [5-10 ans]), le second modèle améliore la prise en compte de l'âge en l'intégrant dans le modèle comme variable continue dans le calcul de la probabilité de maladie.

Conclusion

Les pratiques de préparation des viandes, la quantité d'aliment ingéré, la taille des lots contaminés, la sensibilité des personnes exposées sont autant de facteurs qui contribuent (avec les niveaux de contamination) à la survenue de cas d'infection à EHEC associés à un lot de fabrication.

Les données récentes ne permettent ni de remettre en cause ni d'améliorer la relation dose-réponse qui prend le mieux en compte la population d'intérêt de la présente saisine, c'est-à-dire les enfants de moins de 15 ans.

Il n'existe pas de concentration seuil en-dessous de laquelle il n'y aurait jamais d'épidémie. Pour une population sensible donnée (par exemple les enfants de moins de 15 ans) dont on connaîtrait la consommation annuelle ainsi que les pratiques de préparation des aliments considérés et donc l'exposition au danger, il est néanmoins possible d'estimer :

- le nombre annuel de cas et son incertitude,
- si un risque acceptable (ou niveau approprié de protection sanitaire – Appropriate Level of Protection/ALOP) est indiqué par le gestionnaire du risque, une dose telle que la probabilité de ne pas respecter ce risque acceptable ne dépasse pas 1% ou toute autre valeur fixée par le gestionnaire du risque, et l'incertitude autour de cette probabilité.

Dans la suite de ce rapport, l'expertise portera sur la prévention des cas de SHU dans leur totalité (cas sporadiques et épidémies).

3.4. Modélisation de la contamination des matières premières et des mêlées de viande hachée et évaluation de l'impact des mesures de gestion sur la réduction du risque du SHU

3.4.1. Description de la filière viande hachée

Depuis 2006, les animaux amenés à l'abattoir sont classés en fonction de leur état de propreté de A à D (A : animal propre ; D : animal très sale) selon une grille interprofessionnelle basée sur la prise en compte des souillures visibles sur le cuir des animaux. Lors des différentes étapes d'abattage, les carcasses, initialement stériles, peuvent être contaminées en surface notamment pendant les opérations de dépouille et d'éviscération. C'est pourquoi un certain nombre de bonnes pratiques et mesures de maîtrise ont été mises en place et inscrites dans les plans de maîtrise interprofessionnels. Ainsi lors des opérations de pré-dépouille et d'habillage, outre l'hygiène des mains et la décontamination du matériel, les carcasses contaminées par les cuirs doivent être repérées et les quartiers souillés sont marqués. Un traitement approprié est appliqué pour les souillures dites « spot » c'est-à-dire localisées et de taille réduite sans écoulement. Le traitement consiste à parer le morceau souillé (parage avec ou sans traitement à la vapeur). Le parage et le traitement éventuel à la vapeur d'eau sont effectués sur la chaîne. En cas de souillure étendue, les carcasses sont gérées hors cadence. Pour la fabrication de viande hachée réfrigérée (VHR) les carcasses souillées sont exclues. Pour la fabrication de viande hachée surgelée (VHS) seuls les quartiers souillés sont exclus.

De la même façon, en cas de contamination fécale ou ruminale des carcasses, la gestion est faite en fonction de la taille des souillures : parage avec ou sans traitement par la vapeur pour les souillures spots, exclusion des quartiers ou de la carcasse pour les souillures étendues.

Les quartiers de carcasse non exclus sont ensuite expédiés ou dirigés vers les ateliers de découpe. L'étape de découpe consiste à désosser les quartiers et découper la viande en morceaux. Les différents morceaux obtenus sont triés en fonction de leurs caractéristiques et de leur destination.

Les morceaux de viande destinés à la fabrication des viandes hachées constituent les viandes pour haché (**VPH**, anciennement appelée « minerais »). Le terme « VPH » désigne un mélange de muscles avec les tissus attenants, éventuellement coupés en gros morceaux ou un mélange de muscles et d'affranchis⁴ (maximum 50%) obtenus sur la même journée de production. Une **unité de VPH** est constituée de morceaux de viande choisis dont la composition dépend du taux de matière grasse souhaité (5%, 15% ou 20%). Les morceaux peuvent provenir de plusieurs carcasses. Le nombre de carcasses mis en œuvre par unité de VPH ainsi que la taille d'une unité de VPH sont très variables.

Les délais maximum de conservation des viandes après abattage pour la fabrication des viandes hachées bovines sont de six jours pour les viandes réfrigérées et 15 jours pour les viandes désossées et emballées sous vide (Règlement (CE) n°853/2004). Pour les viandes hachées réfrigérées, les VPH issus du désossage et de la découpe sont conservés dans des chambres froides (entre 0 et 1°C) durant un à deux jours avant d'être utilisées. Les viandes hachées surgelées peuvent être fabriquées à partir de VPH réfrigérées ou congelées avec un ratio réfrigéré/congelé variable selon la disponibilité des viandes et la cadence des fabrications.

Une **mêlée** de viande hachée est définie ici comme un ensemble de produits microbiologiquement similaires représentant le contenu d'un ou plusieurs mélangeurs pendant une période définie de production ; ce ou ces mélangeurs peuvent contenir des matières issues d'un ou plusieurs broyeurs. La mêlée ainsi définie sert de base, dans le plan de maîtrise sanitaire des entreprises, pour la gestion des non-conformités microbiologiques.

Bien qu'il n'existe pas de critère microbiologique défini dans le règlement (CE) n°2073/2005 pour les STEC dans les viandes hachées, la DGAL recommande de prendre en compte les EHEC appartenant au 5 sérotypes majeurs (« STEC considérées comme hautement pathogènes ») comme un danger et de mettre en place des autocontrôles microbiologiques en vue de vérifier l'efficacité des mesures de maîtrise. L'échantillonnage minimal préconisé par l'instruction technique DGAL/SDSSA/2016-353 est le suivant: (i)

⁴ Morceaux de muscles squelettiques de toutes tailles reconnus aptes à la consommation humaine, avec leurs tissus graisseux et conjonctifs résiduels obtenus après parage.

pour les VHS : recherche systématique dans chaque mêlée (n=1, recherche dans 25g) du sérotype O157:H7 et au minimum une analyse par semaine (n=1, recherche dans 25g) pour les quatre autres sérotypes; (ii) pour les VHR : recherche du sérotype O157:H7 dans une mêlée au moins une fois par semaine (n=1, recherche dans 25g) en modifiant le jour de prélèvement pour couvrir tous les jours de la semaine. Il peut néanmoins s'avérer pertinent d'augmenter cette fréquence dans le cas d'ateliers à fort tonnage de production ayant un nombre élevé de mêlées fabriquées quotidiennement, ou dans des situations particulières (obtention d'un résultat non conforme, gestion d'une alerte STEC). D'autre part, pour les produits sensibles (viande hachée à consommer crue de type « tartare » ou gamme destinée aux enfants), la fréquence d'analyse doit être renforcée.

Suite à un résultat confirmé positif, des analyses complémentaires doivent être réalisées par le fabricant. Les annexes 2 et 3 de l'instruction technique DGAL/MUS/2015-888 détaillent les méthodes d'analyse et le plan d'échantillonnage à réaliser. Ces analyses complémentaires portent sur la mêlée détectée positive (m) ainsi que sur les mêlées fabriquées avant (m-1, m-2, etc.) et après celle-ci (m+1, m+2, etc.). En dehors d'un contexte de cas humain, ces analyses complémentaires sont réalisées selon deux échantillonnages possibles au choix du fabricant : (i) le nombre d'échantillons analysés (n) est variable et inférieur à 30 (cas n°1) ; (ii) n est égal à 30 (cas n°2) (n=29 sur la mêlée détectée positive à l'origine des analyses complémentaires).

Quel que soit l'échantillonnage choisi, si les résultats d'analyse sont non conformes pour les mêlées m-1 et m+1, des analyses complémentaires sont réalisées sur les mêlées encadrantes (m-2 et m+2) et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de résultats conformes (application de la cascade) ou qu'une opération de nettoyage/désinfection de la ligne de fabrication ait été mise en œuvre. De manière générale, le retrait ou le rappel doivent être appliqués à toutes les mêlées ayant donné au moins un résultat non conforme (présence dans 25g) suite aux contrôles complémentaires.

➤ Bilan des réponses apportées au questionnaire destiné aux établissements producteurs de VHR et VHS

Un questionnaire élaboré par l'Anses a été adressé aux producteurs de VHR et VHS par l'intermédiaire des fédérations professionnelles. Des éléments d'information ont été recueillis sur les points suivants :

- La gestion des matières premières (VPH) : définition du lot, nombre d'unité de VPH entrant dans la composition d'une mêlée, description des analyses réalisées (méthode, plan d'échantillonnage, fréquence) ;
- Les analyses réalisées sur les mêlées ou les produits finis : méthode, plan d'échantillonnage, fréquence, type d'analyse (pool ou individuel), définition d'un résultat positif présomptif, les résultats avec éventuellement la confirmation du LNR ;
- Les analyses réalisées sur les mêlées encadrantes.

Des réponses ont été transmises par 22 sites de fabrication de viande hachée, dont 10 sites de fabrication de VHR, 8 sites de fabrication de VHS et 4 sites fabricant de la VHR et de la VHS. Entre 2013 et 2015, le volume annuel moyen représenté par ces 22 sites était de 131 764 tonnes dont 79% de gamme standard VHS et 30% de gamme standard VHR, les gammes « tartare » et « enfant » représentant environ 1% de la production totale de viande hachée (Figure 3).

Volume de production (2013-2015)

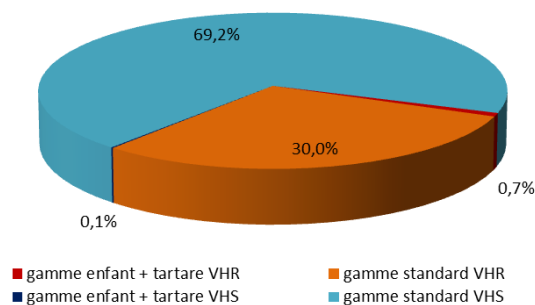


Figure 3. Pourcentage du volume moyen de production annuel en VHR et VHS selon la gamme

- Gestion des VPH

Pour chaque site interrogé, les valeurs minimales, maximales et modales (valeurs les plus fréquentes) ont été renseignées pour (i) la taille des unités de VPH, (ii) le nombre d'unités de VPH entrant dans la composition d'une mûlée et (iii) la taille d'une mûlée.

Selon les résultats de ce questionnaire, la taille des unités de VPH utilisées pour la fabrication de VHS varie entre 50 kg et 9000 kg avec un mode variant entre 750 et 6000 kg en fonction des ateliers. Pour la fabrication de VHR, les unités de VPH utilisées ont une taille comprise entre 10 kg et 2000 kg avec une valeur modale variant entre 90 kg et 1500 kg en fonction des ateliers.

Le nombre d'unités de VPH utilisé pour la fabrication d'une mûlée varie également en fonction des ateliers et du type de viande hachée produite. En VHS, une mûlée est constituée par 1 à 50 unités de VPH, les valeurs les plus fréquentes étant comprises entre 2 et 10. En VHR, le nombre d'unité de VPH entrant dans la composition d'une mûlée varie de 1 à 22, les valeurs les plus fréquentes étant comprises entre 1 et 5.

La taille d'une mûlée est également très variable en fonction du type de fabrication et des ateliers. D'après les résultats du questionnaire, elle varie entre 200 kg et 2000 kg dans le cas de production VHS, les valeurs les plus souvent observées étant comprises entre 600 kg et 1500 kg ; en VHR la taille des mûlés varie entre 15 kg et 2600 kg, les valeurs les plus fréquentes étant comprises entre 30 kg et 1100 kg.

- Analyses réalisées sur les mûlés ou produits finis

D'après les résultats des questionnaires, entre 2013 et 2015, 140 920 analyses de recherche de STEC ont été réalisées dans des mûlés ou produits finis. Si globalement le nombre d'analyses augmente chaque année (2013 : 37 724 analyses, 2014 : 43 582 analyses ; 2015 : 59 614 analyses) ce n'est pas le cas pour chacune des gammes de produit. En effet, seule la gamme standard et en particulier en VHS est concernée (Figure 4).

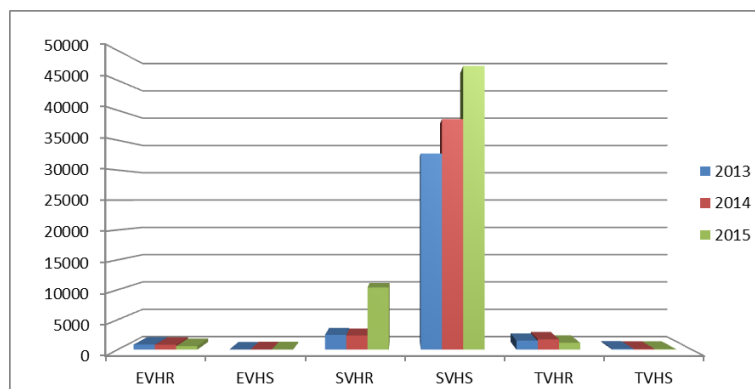


Figure 4. Evolution du nombre d'analyses de recherche de STEC par gamme de produits entre 2013 et 2015 (EVHR : gamme enfant VHR, EVHS : gamme enfant VHS, SVHR : gamme standard VHR, SVHS : gamme standard VHS, TVHR : gamme tartare VHR, TVHS : gamme tartare VHS)

Parmi ces analyses, 84% ont été réalisées en gamme standard VHS contre 10% en gamme standard VHR. 77,2 % de l'ensemble des analyses concernaient le sérotype O157:H7 uniquement, 5% la recherche des sérotypes appartenant au TOP 5 (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28, O111:H8) et 22,3% la recherche des sérotypes du TOP 7 (TOP 5+ O45:H2 et O121:H19).

L'évolution des types d'analyses effectuées entre 2013 et 2015 (recherche du sérotype O157:H7, recherche des sérotypes appartenant au TOP 5, recherche des sérotypes appartenant au TOP 7) selon la gamme de produit est représentée en figure 5. La proportion des analyses ciblées sur le sérotype O157:H7 reste relativement stable et comprise entre 63% et 67% en gamme standard VHS. Très peu d'analyses portent sur la recherche du TOP 5 puisqu'elles représentent, toutes gammes confondues, moins de 1% des analyses annuelles. En revanche, la recherche du TOP 7 représente environ 20% des analyses annuelles et est essentiellement réalisée en gamme standard VHS bien qu'en 2015 elle ait également été utilisée pour certaines fabrications de gamme standard réfrigérée (Figure 5).

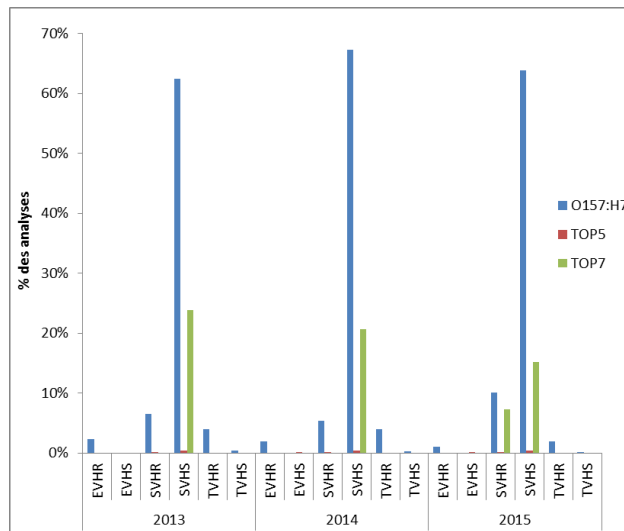


Figure 5. Évolution des sérotypes de STEC recherchés lors des autocontrôles en fonction des gammes de produits entre 2013 et 2015 en pourcentage d’analyses réalisées annuellement.

Tous les échantillons positifs présomptifs ne font pas l’objet d’une analyse de confirmation par le LNR. La gestion d’un échantillon positif présomptif est en général similaire à celle d’un échantillon confirmé positif : retrait, rappel ou réorientation.

Le taux de résultats positifs présomptifs est inférieur à 0,5% toutes gammes confondues entre 2013 et 2015 avec une variabilité importante entre les gammes de produits. En effet, dans la gamme « enfant » qui représente 1,6% des analyses annuelles, aucun résultat positif présomptif n’a été déclaré entre 2013 et 2015. De la même façon, pour la gamme tartare surgelée, aucun résultat présomptif n’est obtenu suite aux 342 analyses effectuées de 2013 à 2015. En revanche, pour la gamme tartare réfrigérée, qui représente 3% des analyses totales, le pourcentage d’échantillons positifs présomptifs qui était de 0% en 2013 a augmenté en 2014 (0,29%) et 2015 (0,44%) bien que le nombre d’analyses soit resté stable et qu’il s’agisse toujours d’une recherche de *E. coli* O157:H7. Parmi les 10 échantillons présomptifs observés entre 2013 et 2015 dans cette gamme, 2 échantillons ont été envoyés au LNR pour confirmation et aucun d’eux n’a été confirmé (Figure 7).

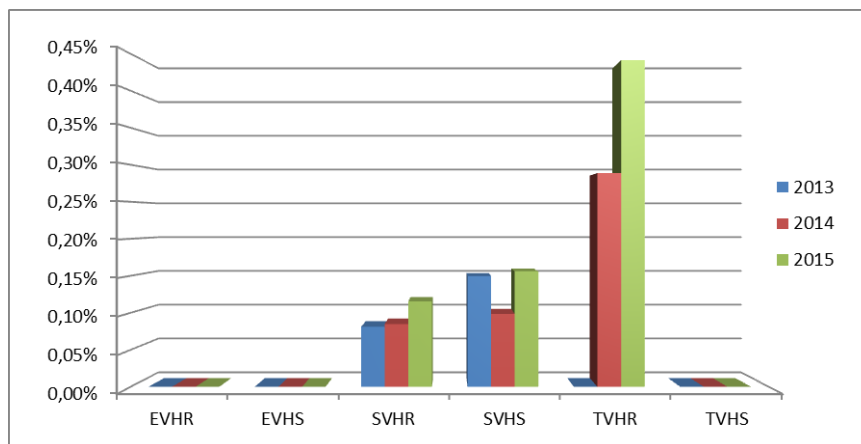


Figure 6. Évolution du pourcentage de résultats positifs présomptifs par gamme de produits entre 2013 et 2015
NB : La définition d’un résultat positif présomptif diffère selon la méthode analytique utilisée.

En gamme standard réfrigérée, le taux moyen de positifs présomptifs sur les trois années est de 0,09% (Figure 6). En 2013 et 2014, la totalité des échantillons présomptifs obtenus en standard VHR ont été envoyés au LNR pour confirmation du résultat ; le taux de confirmation observé est d’environ 50%. En 2015, 25% des échantillons positifs présomptifs en gamme standard VHR ont été envoyés au LNR (n=3) aucun des échantillons n’a été confirmé positif (Figure 7).

Concernant la gamme standard surgelée, le taux moyen de positifs présomptifs est de 0,13% (Figure 6). Le pourcentage d'échantillons positifs présomptifs envoyés au LNR est de 84% en 2013, 60% en 2014 et 53% en 2015. Le taux de confirmation de ces échantillons pour les trois années est respectivement de 51%, 48% et 56% (Figure 7).

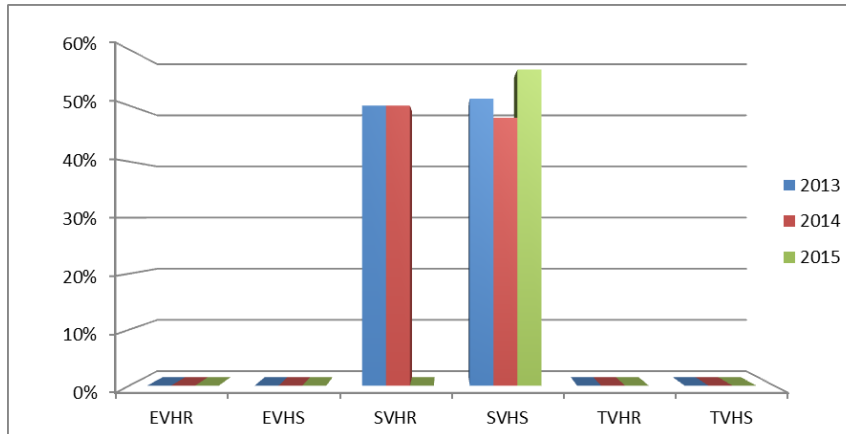


Figure 7. Évolution du taux de confirmation des échantillons positifs présomptifs envoyés au LNR par gamme de produit

- Analyse des mêlées encadrantes

D'après les questionnaires renseignés par 22 ateliers de fabrication de viande hachée, tous ne réalisent pas d'analyses complémentaires sur les mêlées encadrantes. En effet, 14 seulement déclarent faire ces analyses dont 6 ateliers de fabrication de VHR (parmi les 10 interrogés), 6 ateliers de fabrication de VHS (parmi les 8 interrogés) et 2 ateliers de fabrication de VHS et VHR (sur les 2 interrogés). Il est à noter que certains ateliers détruisent ou orientent vers d'autres productions (cuisson) les mêlées m+1 et m-1 encadrant une mêlée positive systématiquement sans les analyser.

D'après les questionnaires, sur l'ensemble des sites de fabrication, entre 2013 et 2015, 77 mêlées ont fait l'objet d'analyses complémentaires (75 mêlées de gamme standard VHS et 2 mêlées de gamme standard VHR). Parmi ces mêlées analysées, 45 ont été retrouvées non conformes suite aux analyses complémentaires. Pour 29 des 77 mêlées détectées positives, les mêlées encadrantes ont été détectées non conformes à des niveaux pouvant aller jusqu'à m-3 ou m+3.

3.4.2. Modélisation de la contamination des matières premières (VPH) et des mêlées de viande hachée

Le modèle développé dans cet avis est basé sur différents modèles publiés (Cassin *et al.* 1998, Cummins *et al.* 2008, Smith, Fazil, et Lammerding 2013, Anses 2014, 2015) et simule les différentes étapes de la fabrication de steaks hachés depuis l'abattage des bovins jusqu'à la sortie d'usine des produits finis puis leur consommation. L'objectif du modèle est d'estimer et de comparer l'efficacité de différents plans d'échantillonnage et des mesures de gestion proposés par la DGAL sur la réduction de la probabilité de survenue de cas de SHU liés à la consommation de steaks hachés de viande de bœuf. La structure du modèle et les différentes étapes de calculs sont celles présentées dans les avis de l'Anses de 2014 et 2015. Par ailleurs, des modifications ont été apportées suite à l'obtention de nouvelles données et aux nouvelles questions posées par la DGAL.

L'originalité de ce modèle consiste à tenir compte (i) des différents types de souillures pouvant contaminer les carcasses entrant dans la fabrication de viandes hachées, (ii) de la répartition des unités de VPH entre les mêlées (Figure 8) et (iii) des mêlées dites « encadrantes ».

De même que pour les modèles précédents, en l'absence de données permettant de caractériser la distribution des niveaux de contamination des VPH et des mêlées de viandes hachées par les STEC en France, ceux-ci sont simulés à l'aide d'un modèle mathématique à partir des niveaux de contamination des fèces de bovins.

Les paramètres d'entrée du modèle sont présentés en annexe 3.

Pour répondre à la question n°4 de la saisine, les plans d'échantillonnage évalués dans cet avis consistent à analyser pour chaque mêlée :

- Plan n°1 : 1 échantillon de 25g (n=1, m=absence dans 25g) ;
- Plan n°2 : 3 échantillons de 25g (n=3, c=0, m=absence dans 25g) ;
- Plan n°3 : 1 échantillon de 75g (n=1, m=absence dans 75g).

Pour répondre à la question n°5, la fabrication de mêlées à partir de différentes unités de VPH ainsi que le concept de mêlées encadrantes sont modélisés. Deux scénarios d'analyses des mêlées sont évalués et comparés en termes de réduction du risque de SHU et de proportion de mêlées détectées positives :

- Scénario 1 : analyse systématique des mêlées selon un plan d'échantillonnage défini ;
- Scénario 2 : analyse systématique des mêlées selon un plan d'échantillonnage défini suivie d'une analyse renforcée des mêlées encadrantes (mêlées encadrant une mêlée initialement détectée positive).

Les modifications apportées aux modèles présentés dans l'avis 2013-SA-0223 (Anses 2014) sont détaillées dans les paragraphes suivants.

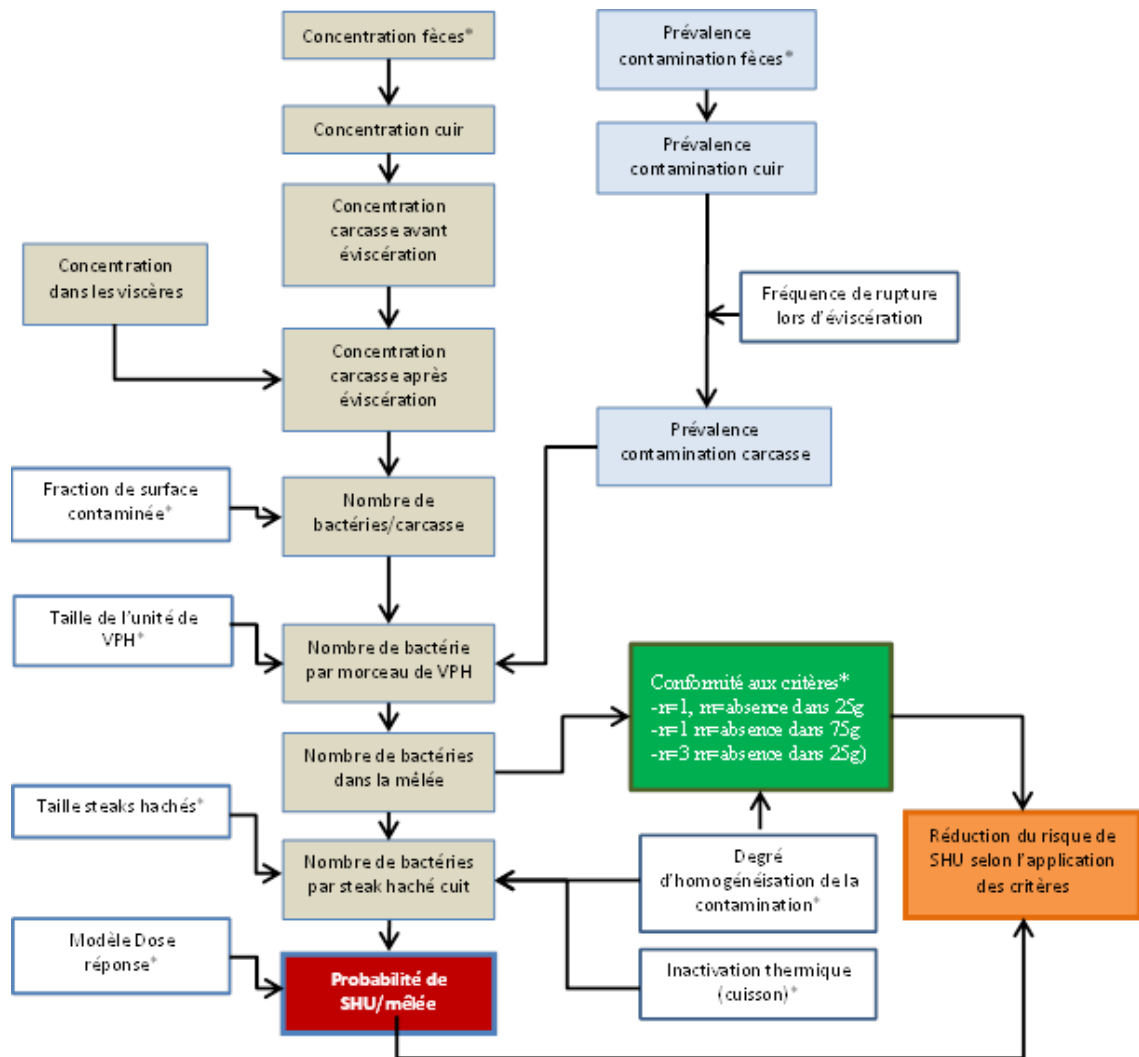


Figure 8. Structure générale du modèle adaptée du modèle de l'avis de l'Anses 2014

Encadrés bleus : prévalence de la contamination en EHEC ; encadrés gris : quantité/concentration de la contamination ; encadrés rouge/vert/orange : sorties du modèle. Les paramètres marqués du symbole * sont modifiés par rapport au modèle de l'avis de 2014 (cf. Tableau annexe 3).

➤ Prévalence d'animaux excréteurs (contamination des fèces)

La prévalence d'animaux excréteurs a été estimée grâce à une étude conduite dans six abattoirs en France entre octobre 2010 et juin 2011 (Bibbal *et al.* 2015). Au total, 1318 animaux appartenant aux quatre principales catégories de bovins (jeunes bovins de race laitière (JBL), jeunes bovins de race à viande (JBV), vaches laitières (VL), vaches à viande (VV)) ont été prélevés dans six abattoirs différents. La prévalence des cinq sérotypes majeurs (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28) a été estimée dans les fèces de ces animaux. Parmi les animaux prélevés, 2,4% ([1,8% ; 3,5%] ; intervalle de confiance à 95%) excrètent l'un des cinq sérotypes majeurs des EHEC. En tenant compte de la proportion d'animaux appartenant aux différentes catégories, la prévalence globale de bovins adultes excréteurs est estimée à 1,8%. En regroupant les analyses en deux périodes distinctes, octobre à février, et mars à juin, la prévalence observée au printemps était 3,3 fois plus élevée que celle observée en hiver ([1,5 ; 7,3] ; intervalle de confiance à 95%) à savoir 1,2% en hiver et 3,9% au printemps. Le modèle utilisé dans cet avis considère les deux périodes d'excrétion contrairement au modèle de l'avis de 2014 dans lequel seule la période de forte excrétion était prise en compte.

Étant donné l'absence de démonstration d'une éventuelle différence de virulence entre les cinq sérotypes majeurs, le modèle développé dans cet avis utilise la prévalence de ces cinq sérotypes pour l'évaluation des risques. Ainsi, dans le modèle, la prévalence de la contamination des fèces pour la période de faible excrétion (automne/hiver) et la période de forte excrétion (printemps/été) sont respectivement $P_{f_{low}} = 1,2\%$ et $P_{f_{high}} = 3,9\%$.

➤ Concentration dans les fèces

Comme pour la prévalence, le niveau de contamination des fèces varie en fonction de la période de prélèvement (Stephens, McAllister, et Stanford 2009). De plus, il est supposé que la variabilité de la contamination en EHEC dans les fèces est la même pour l'ensemble des cinq sérotypes majeurs.

L'étude de Stephens, McAllister, et Stanford (2009) présente la distribution des niveaux de contaminations en O157:H7 chez des bovins dont les échantillons ont été trouvés positifs avec une méthode de détection à deux périodes de l'année : automne-hiver et printemps-été. Les données sont présentées sous forme d'intervalle. Le package R *fitdistrplus* a été utilisé pour ajuster une loi de distribution Normale sur ces données à l'échelle \log_{10} . Ainsi, la loi de distribution utilisée pour la contamination des fèces en période de faible excrétion ($C_{f_{low}}$) suit une loi normale de moyenne 1,59 \log_{10} ufc/g et d'écart type 1,45 et celle utilisée pour la contamination des fèces en période de forte excrétion ($C_{f_{high}}$) suit une loi normale de moyenne 2,44 \log_{10} ufc/g et d'écart type 1,98.

➤ Contamination des carcasses par les cuirs avant éviscération

Lors du dépouillement, la contamination des carcasses peut se produire par un contact direct avec le cuir ou indirectement par les poussières échappées du cuir, les mains ou les ustensiles utilisés. La prévalence de carcasses contaminées par le cuir P_c est décrite dans le modèle de l'avis de l'Anses de 2014 (Anses 2014).

La concentration en EHEC (C_c) des souillures provenant du cuir est décrite dans l'avis de l'Anses de 2014 et dépend de la concentration en EHEC sur le cuir (C_{cuir}) et de la fraction de transfert du cuir vers la surface de la carcasse (FT_{cuir}) définis dans le tableau de paramètres d'entrée du modèle (Annexe 3).

Dans le présent avis, le modèle utilisé considère deux types de souillures observées en abattoir : les souillures dites « spot » n'excédant pas 3 cm de diamètre et les souillures circonscrites dont la surface correspond à la taille d'une main (Cartier 2009) ; ces dernières seront désignées par la suite par le terme de souillure « main »⁵. Dans cette étude, 70 carcasses faisant l'objet de souillures circonscrites en provenance du cuir sur une chaîne d'abattage ont été observées. 80% des souillures observées correspondent à des « spots » et 20% à des souillures « main » (Cartier 2009). Les contaminations étendues, c'est-à-dire d'une taille supérieure à la surface de la paume d'une main ne sont pas prises en compte par le modèle. En effet,

⁵ Le plan de maîtrise pour les *E. coli* pathogènes pour les viandes hachées et préparations de viandes hachées réfrigérées et surgelées réalisé par Culture Viande (janvier 2016) définit une contamination « spot » comme « localisée, de taille réduite (de taille inférieure ou égale à une paume de main) en l'absence d'écoulement et pouvant être parée d'un seul geste par l'opérateur sur chaîne ». Cette définition englobe donc les souillures de type « spot » et de type « mains » définies dans le présent avis.

ces contaminations font l'objet de mesures de gestion strictes entraînant l'exclusion des morceaux concernés de la fabrication pour les viandes hachées réfrigérées et surgelées.

Dans le modèle, la proportion de souillures « spots » P_{spot} est fixée à 80%. La surface de ces souillures S_{spot} est fixée à 7 cm^2 correspondant à un spot de 3 cm de diamètre. La proportion de souillures « main » par le cuir P_{main} est fixée à 20% avec une surface S_{main} fixée à 150 cm^2 .

Le nombre de souillures présentes sur une carcasse contaminée ($N_{souillures}$) suit une distribution de Poisson ($m_{souillures}$) avec $m_{souillures}$ le nombre moyen de souillures par carcasse. En l'absence de données sur ce nombre moyen, il est considéré comme un paramètre incertain du modèle. Les simulations sont donc réalisées pour plusieurs valeurs de $m_{souillures}$ entre 1 et 20 avec une valeur par défaut de 10 ce qui permet d'estimer l'impact de ce paramètre sur les résultats du modèle. Le nombre de spots N_{spot} est estimé pour chaque carcasse contaminée et suit une distribution Binomiale de paramètre $N_{souillures}$ et P_{spot} . La surface totale de contamination d'une carcasse a est définie par :

$$a = N_{spot} \times S_{spot} + (N_{souillures} - N_{spot}) \times S_{main} \quad \text{Équation 1}$$

Avec : a la surface de contamination de la carcasse (cm^2)
 N_{spot} le nombre de souillures de type « spot » sur la carcasse
 $N_{souillure}$ le nombre total de souillures sur la carcasse
 S_{spot} la surface d'une souillure de type « spot » (cm^2)
 S_{main} la surface d'une souillure de type « main » (cm^2)

Le modèle tient compte des contrôles visuels tout au long de la chaîne d'abattage et considère une sensibilité (ou probabilité) de détection des spots (Se_{spot}) et des souillures « main » (Se_{main}). En l'absence de données sur ces niveaux de sensibilité, ces paramètres sont considérés comme des paramètres incertains du modèle pour lesquels plusieurs valeurs sont donc considérées avec par défaut une valeur $Se_{spot} = 0,5$ et $Se_{main} = 0,8$.

La sensibilité de détection des souillures intègre l'efficacité du traitement (parage et/ou vapeur d'eau). Autrement dit, la totalité de la contamination provenant des souillures détectées est éliminée. Ce sont donc les souillures non détectées qui sont responsables de la contamination de la viande. Le nombre de spots et de souillures mains non détectées notés respectivement $N_{spot_restant}$ et $N_{main_restant}$ sont variables d'une carcasse contaminée à une autre et suivent une distribution binomiale de probabilité $(1 - Se_{spot})$ et $(1 - Se_{main})$ et de taille N_{spot} et $(N_{souillures} - N_{spot})$.

La surface de contamination des carcasses après contrôle et traitement des souillures détectées est notée a_{corr} :

$$a_{corr} = N_{spot_restant} \times S_{spot} + N_{main_restant} \times S_{main} \quad \text{Équation 2}$$

Avec : a_{corr} la surface de contamination de la carcasse après contrôle et traitement (cm^2)
 $N_{spot_restant}$ le nombre de souillures de type « spot » restantes sur la carcasse après traitement
 $N_{main_restant}$ le nombre de souillures de type « main » restantes sur la carcasse après traitement
 S_{spot} la surface d'une souillure de type « spot » (cm^2)
 S_{main} la surface d'une souillure de type « main » (cm^2)

➤ Contamination des carcasses suite à un accident d'éviscération

La contamination des carcasses par accident d'éviscération (perforation ou mauvaise préparation du tube digestif) est modélisée tel que décrit dans l'avis de l'Anses de 2014 en faisant l'hypothèse que la concentration en EHEC dans les viscères est la même que celle dans les fèces (C_f). Cependant, la valeur maximale de la quantité de contenu du tube digestif sur la carcasse (q) restante après parage et traitement éventuel est abaissée de 50 g à 20 g afin d'être plus proche des observations de terrain.

➤ Quantité de bactéries par carcasse contaminée à l'issue de l'abattage

A l'issue de l'abattage, un nombre $Cont_c$ de carcasses se trouve contaminé par les EHEC par le cuir et/ou par le contenu des viscères. Pour chacune des carcasses contaminées, la surface de contamination de la

carcasse et le nombre d'EHEC sur la carcasse sont estimés. La surface totale d'une carcasse standard (TSA) est supposée égale à 32 000 cm².

- Nombre de bactérie provenant de contamination par le cuir

Le nombre de bactéries contaminant la carcasse provenant du cuir (O_h) est égal à :

$$O_h = a_{corr} \times 10^{C_c} \quad \text{Équation 3}$$

Avec : O_h le nombre d'EHEC par carcasse contaminée provenant du cuir (log₁₀ ufc)
 a_{corr} la surface de contamination de la carcasse après contrôle et traitement (cm²)
 C_c la concentration en EHEC à la surface d'une carcasse suite à une contamination par le cuir (log₁₀ ufc/cm²)

- Nombre de bactéries provenant d'une contamination par accident d'éviscération

Le nombre de bactéries contaminant la carcasse provenant du contenu des viscères (O_v) est égal à :

$$O_v = q \times 10^{C_f} \quad \text{Équation 4}$$

Avec : O_v le nombre de EHEC par carcasse contaminée par les viscères (log₁₀ ufc)
 q la quantité de contenu des viscères souillant la carcasse (g)
 C_f la concentration en EHEC dans les fèces et les viscères (log₁₀ ufc/g)

- Nombre de bactéries provenant d'une contamination par le cuir et par accident d'éviscération

La quantité de bactéries par carcasse contaminée (O_c) résultant d'une contamination par les cuirs et par les viscères est alors égale à :

$$O_c = O_h + O_v \quad \text{Équation 5}$$

Avec : O_c le nombre d' EHEC par carcasse contaminée par le cuir et par les viscères (log₁₀ ufc)
 O_v le nombre d' EHEC par carcasse contaminée par les viscères (log₁₀ ufc)
 O_h le nombre d' EHEC par carcasse contaminée provenant du cuir (log₁₀ ufc)

➤ Contamination des unités de VPH

Le nombre de carcasses contaminées par unité de VPH (K) est décrit dans l'avis de l'Anses de 2014 pour des unités de VPH composées de viande provenant de 60 animaux. Pour chacune des K carcasses contaminées, une série de calculs est déroulée pour arriver à déterminer le nombre de bactéries par morceaux et par carcasse tel que décrit dans l'avis de l'Anses de 2014 permettant d'estimer ainsi le nombre total attendu de bactéries par unité de VPH (N).

➤ Contamination des mêlées

La composition des mêlées à partir des unités de VPH est modélisée selon deux scénarios. Le premier scénario permet d'estimer le risque de SHU et de tester les différents plans d'échantillonnage sur mêlée à partir du nombre total de bactéries dans la mêlée et du coefficient d'homogénéité de la mêlée (b) en considérant qu'une mêlée est fabriquée à partir d'une unité de VPH. Ce scénario permet donc de répondre à la question n°4.

Le second scénario, plus complexe dans la modélisation de l'utilisation des unités de VPH pour la fabrication des mêlées, permet de répondre à la question n°5 sur l'évaluation des niveaux de contamination des mêlées encadrantes (cf. section 3.4.6).

Le modèle considère qu'une mêlée est constituée par une unité de VPH de taille égale ($M_M = M_{VPH} = 1\ 000$ kg). Les opérations de broyage et de hachage ne permettent pas une distribution totalement homogène des bactéries présentes sur la viande de l'unité de VPH. Le degré d'homogénéisation atteint suite aux différentes opérations dépend de la proportion des morceaux de VPH contaminés et de leur répartition dans l'unité de VPH. Si le hachage conduisait à une unité de mêlée parfaitement homogène, alors tous les steaks hachés

présenteraient le même niveau moyen de contamination (λ , nombre de bactéries par unité de VPH divisé par la masse de l'unité de mûlée : $\lambda=N/T$). Cependant, le hachage ne conduit pas à une homogénéité parfaite dans la viande hachée. La distribution de la contamination peut être décrite à l'aide d'une loi de probabilité Gamma-Poisson telle que décrite dans l'avis de l'Anses (2014). Selon cette distribution, le nombre de bactéries par gramme de steak haché suit une loi de Poisson de paramètre λ et ce paramètre (λ) suit une loi Gamma (Nauta, 2005). La probabilité d'avoir x bactéries dans un steak haché de 100 g est calculée à partir de la formule suivante :

$$P(x) = \frac{\Gamma(b+x)}{x!\Gamma(b)} \times \frac{b^b \lambda^x}{(\lambda+b)^{b+x}} \quad \text{Équation 6}$$

Avec : b le coefficient mesurant l'hétérogénéité (quand b tend vers l'infini, le modèle est équivalent à une loi de Poisson),

et λ la concentration moyenne dans 100 g de viande hachée prélevé aléatoirement dans une unité de mûlée.

Une étude de l'IDELE récemment publiée présente des résultats expérimentaux de dispersion de la contamination dans des mûlées de 25 kg pour différents niveaux de contamination initiale de la mûlée et pour des mûlées 100% réfrigérées ou de mélange réfrigéré/surgelé (Loukiadis, Bièche-Terrier, *et al.* 2017). D'après les résultats observés dans cette étude, la valeur du paramètre b ne semble pas significativement influencée ni par les niveaux de contamination testés ni par le type de mélange et est comprise entre 1,0 et 1,6 avec une moyenne à 1,3 ce qui correspond à une distribution moyennement homogène des bactéries dans la mûlée. Il est à noter que les concentrations observées dans les mûlées sont bien inférieures aux concentrations théoriques attendues. Le pourcentage de cellules bactériennes récupérées varie entre 4% et 27%. Deux hypothèses peuvent être avancées : soit la population initiale est devenue non cultivable soit elle n'est pas dispersée par le processus de broyage-mélange et reste fixée localement à un ou deux points de la mûlée. La première hypothèse suppose un biais expérimental dû à la souche utilisée dans l'étude de l'IDELE. Une fraction de la population inoculée présenterait des difficultés à survivre ou à croître sur les milieux sélectifs utilisés après un stress froid ou encore à cause de la compétition avec la microflore déjà présente dans la viande de bœuf crue (Lu *et al.* 2011, Loukiadis, Bièche-Terrier, *et al.* 2017). La seconde hypothèse suppose la présence d'un ou de plusieurs amas non détectés contenant le reste de la population. Cela pourrait être dû à l'attachement des cellules inoculées à la surface de la viande et à l'incapacité du procédé de fabrication à détacher et à disperser ces bactéries.

Il est impossible en l'état actuel des connaissances de privilégier l'une des deux hypothèses. Les plans d'échantillonnage classiques ne sont pas en mesure de détecter cette fraction et leur efficacité ne peut être évaluée que pour la part de contamination qui sera mélangée au cours du processus de broyage. La prise en compte de cette incertitude conduit à une gamme de valeurs de b comprises entre 0,5 et 2.

En conclusion, dans la démarche de modélisation retenue pour répondre aux questions sur l'échantillonnage, il a été considéré que l'ensemble de la contamination apportée par les lots de VPH se répartissait dans la mûlée selon les valeurs de b comprises entre 0,5 et 2.

3.4.3. Calcul des probabilités de détection avec les plans d'échantillonnages sur mûlée selon le scénario 1 de contamination des mûlées

➤ Plan n°1 : $n=1$, m =absence dans 25g

La probabilité de détection de la présence d'EHEC dans une mûlée i avec un échantillon de 25g, $P(D_{25})_i$, est obtenue par :

$$P(D_{25})_i = 1 - \left(\frac{b}{\lambda' + b} \right)^b \quad \text{Équation 7}$$

Avec λ' la quantité moyenne d'EHEC dans un échantillon de 25g de viande hachée prélevée aléatoirement dans une mûlée ;

b le coefficient mesurant l'hétérogénéité (quand b tend vers l'infini, le modèle est équivalent à une loi de Poisson).

➤ **Plan n°2 : n=3, c=0, m=absence dans 25g**

La probabilité de détection de la présence d'EHEC dans une mêlée i dans au moins un échantillon de 25g parmi n échantillons de 25g prélevés $P(D_n)_i$ est obtenue par :

$$P(D_n)_i = 1 - (1 - P(D_{25}))^n \quad \text{Équation 8}$$

➤ **Plan n°3 : n=1, m=absence dans 75g**

La probabilité de détection de la présence d'EHEC dans une mêlée i avec un échantillon de 25g, $P(D_{75})_i$ est obtenue par :

$$P(D_{75})_i = 1 - \left(\frac{b}{\lambda'' + b} \right)^b \quad \text{Équation 9}$$

Avec λ'' la quantité moyenne d'EHEC dans un échantillon de 75g de viande hachée prélevée aléatoirement dans une mêlée.

3.4.4. Estimation du risque de SHU

Les paramètres nécessaires à l'estimation du risque de SHU pour les consommateurs de steaks hachés (paramètres de survie des EHEC au traitement thermique, données de consommation, relation dose-réponse) sont ceux présentés dans le rapport de l'Anses de 2015 (Anses 2015).

Les paramètres de survie des EHEC au traitement thermique sont donnés pour trois types de cuisson (saignant, à point et bien cuit) et quatre catégories de consommateurs en fonction de l'âge : les enfants de moins de 5 ans, les enfants de 5 à 10 ans, les enfants de 10 à 15 ans et les personnes de plus de 18 ans. L'efficacité de la cuisson pour la destruction des EHEC est exprimée en nombre de réductions décimales (RD). La proportion de mode de cuisson appliqué en fonction de l'âge des consommateurs ainsi que le nombre de réductions décimales attendues en fin de cuisson sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9. Proportion (%) de type de cuisson appliqué par classe d'âge de consommateurs et nombre de réductions décimales (RD) du niveau de EHEC par steak haché par type de cuisson

Cuisson/âge	< 5 ans	5-10 ans	10-15 ans	> 18 ans	RD
Saignant	10%	17%	21%	38%	0,5
A point	41%	53%	54%	35%	1,6
Bien cuit	49%	28%	24%	28%	3,9

La relation dose-réponse utilisée ici est celle décrite par Perrin *et al.* (2015). Il s'agit d'un modèle exponentiel dont le paramètre r varie en fonction de l'âge. Le risque, pour un enfant de moins de 15 ans, de développer un syndrome hémolytique urémique suite à la consommation d'un steak haché est obtenu comme suit :

$$R_{\text{âge}} = P_{\text{âge}} \times P_{\text{dose|âge}} \quad \text{Équation 10}$$

$$P_{\text{dose|âge}} = 1 - \exp(-x \times r_{\text{âge}} \times 10^{-RD}) \quad \text{Équation 11}$$

$$r_{\text{âge}} = 10^{-2.33} \times \exp(-0.38 \times \text{âge}) \quad \text{Équation 12}$$

Avec : $P_{\text{âge}}$ la proportion de steaks hachés consommés par les enfants pour chacune des classes d'âge (0 à 15 ans par pas de 1 an)

$P_{\text{dose|âge}}$ la probabilité de survenue d'un cas de SHU sachant la dose ingérée et l'âge du consommateur

x le nombre de bactéries dans une portion de steak haché (dose)

$r_{\text{âge}}$ le paramètre de la relation dose-réponse exponentielle

RD le nombre de réduction décimale en fin de cuisson (Tableau 9)

La probabilité de survenue d'un SHU suite à la consommation d'un steak haché issu d'une mēlée particulière est calculée en tenant compte de la variabilité de la contamination intra mēlée et de la variabilité des modes de cuisson associés à chaque classe d'āge.

La probabilité de survenue d'un SHU suite à la consommation d'un steak haché (provenant d'une mēlée quelconque) est estimée par la moyenne des probabilités par mēlée. Cette probabilité est appelée risque de SHU.

3.4.5. Résultats du modèle

Les résultats présentés ci-dessous sont valables pour les paramètres et hypothèses du modèle définis précédemment. Le modèle considère notamment :

- deux périodes d'excrétion des STEC dans les matières fécales bovines pour lesquelles les concentrations ne sont pas estimées à partir de données françaises contrairement aux prévalences d'animaux excréteurs ;
- l'application d'une méthode analytique parfaite (spécificité et sensibilité de 100%) pour la détection des 5 sérotypes majeurs ;
- des modes de cuisson des steaks hachés en fonction des classes d'āge des consommateurs définis à partir d'estimations réalisées dans le cadre de l'investigation d'une d'épidémie française (Delignette-Muller et Cornu 2008) ;
- la relation dose/réponse établie pour le sérotype O157 :H7 (Perrin *et al.* 2015).

Par conséquent, il est fort probable que le modèle surestime le risque. Le modèle ne s'intéresse toutefois pas à la valeur absolue de ce risque mais à la réduction du risque qui pourrait être obtenue par différentes mesures.

➤ Influence des paramètres incertains sur l'estimation du risque du SHU

L'actualisation du modèle a conduit d'une part, à l'estimation de la gamme d'incertitude entourant la valeur du paramètre b et d'autre part, à l'introduction de trois nouveaux paramètres en lien avec la contamination des carcasses ($m_{\text{souillures}}$, Se_{spot} , Se_{main}). A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude permettant d'estimer statistiquement les valeurs de ces trois paramètres, celles-ci ont donc été proposées à partir des données professionnelles et à dire d'experts. Afin de tester l'influence de ces paramètres d'entrée du modèle (b , $m_{\text{souillures}}$, Se_{spot} , Se_{main}) sur les sorties du modèle (risque de SHU, probabilité de détection des mēlées contaminées), des simulations ont été réalisées pour un scénario correspondant à la période de forte excrétion (Pf_{high} , Cf_{high}). Pour chaque paramètre incertain, plusieurs valeurs sont tirées au sort dans sa gamme d'incertitude. Pour chacune de ses valeurs, 100 000 itérations du modèle sont réalisées en fixant les autres paramètres incertains à leur valeur par défaut (Tableau 10). Pour chaque scénario, le risque moyen de SHU par portion de 100 g est estimé pour deux situations. Dans la première situation, situation de référence, les mēlées de viande hachée ne sont pas analysées. Le modèle considère donc que l'ensemble des steaks hachés fabriqués sont consommés. Le risque estimé dans cette situation est appelé risque de référence (R_0). Dans la seconde situation, les mēlées de viande hachée sont analysées de façon systématique (100% des mēlées analysées) selon le plan d'échantillonnage $n=1$, absence dans 25 g. Le modèle considère que les steaks hachés issus des mēlées détectées positives pour la présence de EHEC suite à l'analyse ne sont pas consommés (lots bloqués). Le risque estimé est le risque résiduel (R_r).

Tableau 10. Valeurs des paramètres incertains tirées au sort et valeur par défaut

Paramètre incertain	Valeurs	Valeur par défaut
b	0,01 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 10	1
$M_{\text{souillures}}$	1 à 20 par pas de 1	10
Se_{spot}	10% à 90% par pas de 10%	50%
Se_{main}	10% à 90% par pas de 10%	80%

Pour chaque paramètre incertain, le risque de référence et le risque résiduel sont estimés et représentés en fonction de la valeur du paramètre incertain. Les résultats sont présentés en annexe 4.

La valeur du paramètre b a peu d'influence sur le niveau de risque de référence lorsque b varie entre 0,01 (répartition de la contamination hétérogène) et 10 (répartition de la contamination homogène). En revanche, lorsque les mêlées sont analysées, l'hétérogénéité de la contamination a un impact important sur l'efficacité de l'échantillonnage et le niveau de risque associé. En effet, plus la contamination est répartie de manière homogène au sein de la mêlée ($b > 1$) plus la probabilité de détection avec le plan d'échantillonnage défini ($n=1$, absence dans 25g) augmente. Les mêlées contaminées ont donc une probabilité plus élevée d'être détectées lorsque la répartition de la contamination est homogène ce qui entraîne une diminution du risque de SHU de plus de 95% lorsque $b > 1$.

Le nombre moyen de souillures ($m_{\text{souillures}}$) par carcasse impacte de façon importante le risque de référence et le risque résiduel, les multipliant par un facteur 5 lorsque le nombre de souillures est augmenté de 1 à 20. Le nombre de souillures influence également légèrement l'efficacité de l'échantillonnage : pour $m_{\text{souillures}}=1$, la probabilité de détection des mêlées est de 1% ; pour $m_{\text{souillures}}=20$, la probabilité de détection est de 4%. Pour un nombre moyen de souillures par carcasse de 10, la probabilité de détection est de 3%. La réduction du risque associée (entre 95% et 98%) n'est cependant pas directement impactée par le nombre de souillures puisque des réductions différentes sont estimées pour des nombres de souillures et une probabilité de détection similaires.

Le modèle est peu sensible à la probabilité de détection des souillures « spot ». En revanche, la probabilité de détection des souillures de type « main », plus importantes en taille mais moins fréquentes que les spots, influence les sorties du modèle. En effet, les risques de référence et résiduel sont divisés par 3 lorsque la probabilité de détection augmente de 10% à 90%.

➤ Probabilité de détection des EHEC selon différents scénarii d'échantillonnage et réduction du risque associée

L'efficacité de trois plans d'échantillonnage est comparée en termes de probabilité de détection des mêlées et pourcentage de réduction du risque moyen de SHU par portion de 100 g de steak haché.

- Plan n°1 : 1 échantillon de 25g ($n=1$, m =absence dans 25g)
- Plan n°2 : 3 échantillons de 25g ($n=3$, $c=0$, m =absence dans 25g)
- Plan n°3 : 1 échantillon de 75g ($n=1$, m =absence dans 75g)

Chacun de ces plans d'échantillonnage est testé pour différents scénarii de contamination décrits dans le tableau 11. Les résultats obtenus avec 300 000 itérations sont présentés par plan d'échantillonnage pour chacun des scénarii étudiés dans le tableau 12 et représentés dans les figures 9 et 10.

Tableau 11. Scénarii de contamination pour lesquels les plans d'échantillonnage sont testés

Scenario	Saison	Hétérogénéité de la contamination intra mêlée (b)	Nombre moyen de souillures par carcasse
S1	Forte excrétion	0,5	10
S2	Faible excrétion	0,5	10
S3	Forte excrétion	1,0	10
S4	Faible excrétion	1,0	10
S5	Forte excrétion	2,0	10
S6	Faible excrétion	2,0	10
S7	Forte excrétion	0,5	5
S8	Faible excrétion	0,5	5
S9	Forte excrétion	1,0	5
S10	Faible excrétion	1,0	5
S11	Forte excrétion	2,0	5
S12	Faible excrétion	2,0	5

Il est à noter que le risque moyen de SHU de référence (sans échantillonnage) en période de faible excrétion est 600 fois plus faible que le niveau de risque estimé en période de forte excrétion.

Tableau 12. Probabilité de détection des mêlées contaminées et pourcentage de réduction du risque moyen de SHU associé par plan d'échantillonnage et par scénario de contamination

Scénario	Plan n°1		Plan n°2		Plan n°3	
	Probabilité de détection	% de réduction du risque	Probabilité de détection	% de réduction du risque	Probabilité de détection	% de réduction du risque
S1	2,68	92,57	5,37	98,15	4,60	95,93
S2	0,05	65,06	0,13	80,35	0,11	76,33
S3	2,96	95,65	5,63	98,72	5,13	97,48
S4	0,06	85,25	0,12	90,76	0,12	93,70
S5	3,14	97,05	5,80	98,76	5,48	98,43
S6	0,06	91,20	0,12	83,98	0,12	86,94
S7	1,84	93,71	3,68	98,25	3,19	94,35
S8	0,04	73,22	0,09	90,48	0,07	70,65
S9	2,02	96,89	3,89	98,87	3,56	98,11
S10	0,04	65,21	0,09	79,88	0,08	92,86
S11	2,16	97,69	3,99	98,39	3,83	98,41
S12	0,04	73,48	0,08	89,97	0,08	89,38

Pour tous les scénarii de contamination, le plan d'échantillonnage le plus efficace en termes de probabilité de détection est le plan n°2 ($n=3$, $c=0$, absence dans 25g) qui permet en période de forte excrétion de détecter 4% à 6% des mêlées et ainsi de réduire le risque moyen de SHU par portion de plus de 98%.

La proportion de mêlées détectées positive avec le plan n°1 ($n=1$, absence dans 25 g) appliqué à 100% des mêlées est comprise entre 0,04% et 0,06% en période de faible excrétion et entre 2% et 3% en période de forte excrétion. La proportion de mêlées détectées positives en période de faible excrétion par ce plan d'échantillonnage est proche de celle observée avec les résultats d'autocontrôles des professionnels : 0,09% de résultats présomptifs (dont 50% confirmés) pour les VHR et 0,13% de résultats présomptifs pour les VHS. Il convient de noter que les autocontrôles réalisés en filière VHR ne sont pas systématiques (environ une mêlée par semaine analysée) et que dans la grande majorité des cas, en VHR comme en VHS, seul le sérotype O157:H7 est recherché. De plus, le modèle suppose une méthode analytique parfaite (sensibilité de 100%) ce qui n'est pas le cas des méthodes utilisées en laboratoire. Ces éléments pourraient expliquer la différence observée entre les taux de détection simulés et les résultats d'autocontrôles observés. Par ailleurs, les valeurs simulées sont cohérentes avec les résultats des plans de surveillance de la DGAL (VHS en 2013 : 0,4% [0,05-1,45] ; VHR en 2015 0,3% [0,01 - 1,9]) lorsque l'on tient compte de l'intervalle de confiance et d'une répartition à part égale des périodes de forte et de faible excrétion.

Le plan n°2, basé sur $n=3$, est le plus efficace en termes de réduction du risque en particulier lorsque la mêlée n'est pas homogène ($b=0,5$) et la contamination faible (S2, S8). La réduction du risque estimée avec le plan n°2 est comprise entre 80% et 90% en période de faible excrétion et supérieure à 98% en période de forte excrétion. Les plans n°1 et n°3, basés sur $n=1$, sont plus sensibles à la valeur de b et moins performants lorsque la contamination est hétérogène et faible.

Globalement, le plan n°1 permet une réduction du risque comprise entre 65% et 85% en période de faible excrétion et supérieure à 92% en période de forte excrétion.

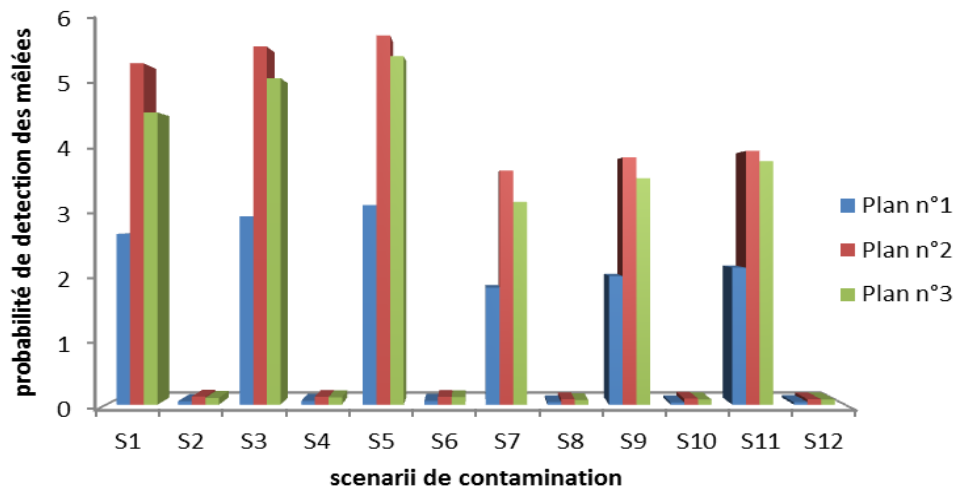


Figure 9. Probabilité de détection des mêlées pour les trois plans d'échantillonnage testés et les 12 scénarii de contamination

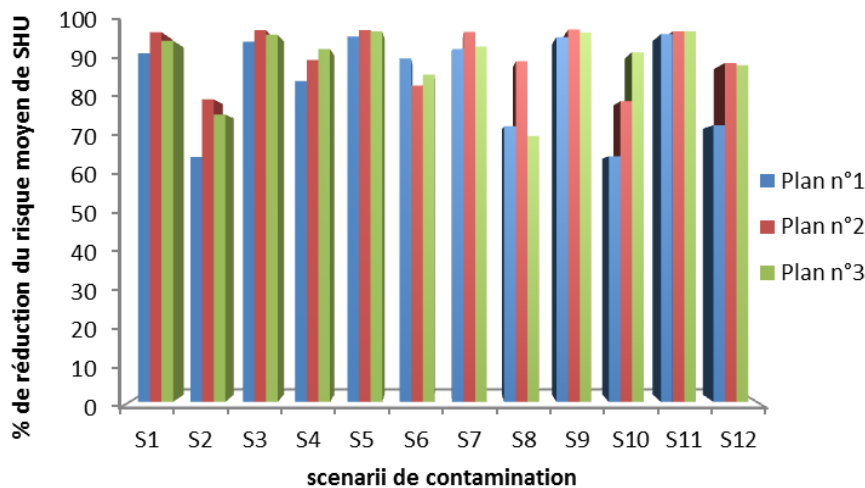


Figure 10. Pourcentage de réduction du risque moyen de SHU par portion de 100g pour les trois plans d'échantillonnage testés et les 12 scénarii de contamination

Selon le modèle, la proportion attendue de mêlées détectées varie de 2% à 6% en période de forte excrétion et de 0,04% à 0,13% en période de faible excrétion. La comparaison des plans d'échantillonnage montre une réduction du risque suite à l'application des 3 plans considérés. Cette réduction du risque est plus importante en période de forte excrétion (92- 98%) par rapport à la période de faible excrétion (57 – 87%).

Compte tenu des incertitudes du modèle, les différences de réductions observées entre les 3 plans ne sont pas significatives. En période de forte excrétion, le plan « n=1, m= absence dans 25 g » permettrait, s'il était appliqué sur toutes les mêlées produites, de diviser par 10 le risque de SHU par steak haché.

➤ **Choix des plans d'échantillonnage vis-à-vis d'un objectif de performance et du niveau de protection des consommateurs**

A partir du modèle de simulation d'évaluation du risque, le risque moyen de SHU lié à la consommation de steaks hachés de 100 g est estimé en fonction de différents niveaux théoriques de contamination des mēlées. Pour cela, la relation dose-réponse intègre les quantités consommées et les habitudes de cuisson en fonction de l'âge des consommateurs. La relation linéaire entre le \log_{10} du risque et celui du niveau de contamination des mēlées en ufc/100 g est représentée dans la figure 11.

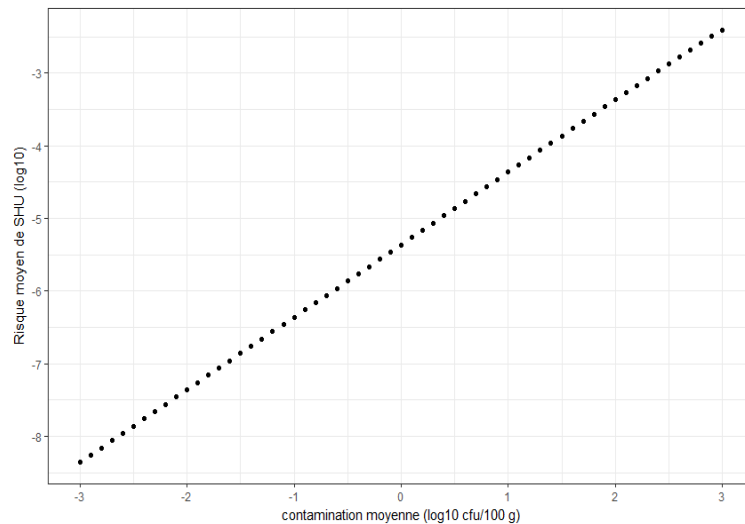


Figure 11. Risque moyen de SHU en fonction du niveau de contamination des mēlées (ufc/100g) (échelles logarithmiques décimales)

Cette relation permet de déterminer la contamination à ne pas dépasser dans le produit fini pour atteindre un niveau de protection ciblé ou niveau de risque à ne pas dépasser. Le niveau de risque s'apparente ici au niveau de protection approprié (ALOP). Le niveau de contamination à ne pas dépasser dans le produit fini pour respecter l'ALOP est un objectif de performance (PO).

À titre d'exemple, pour ne pas exposer les consommateurs de steaks hachés à un risque supérieur à un cas pour 1 million de portions (soit $\log_{10}R = -6$), l'objectif de performance à respecter est de 2×10^{-3} ufc/g (soit $\log_{10}ufc/100g = -0,7$) (Figure 11).

Le nombre d'échantillons de 25 g à analyser pour avoir une probabilité de 95% de détecter les mēlées dont la contamination dépasse l'objectif de performance est calculé pour des ALOP compris entre 10^{-6} et 10^{-3} . Ce nombre d'échantillons (n) dépend de l'hétérogénéité de la répartition de la contamination intra-mēlée décrite par le coefficient b . Le nombre d'échantillons à analyser en fonction du seuil de risque (ALOP) à ne pas dépasser et de b est présenté dans le tableau 13. A titre d'exemple, pour respecter un niveau de risque de 1 cas par million de portions de 100 g et donc respecter un objectif de performance de 2×10^{-3} ufc/g, pour $b=1$, 50 échantillons de 25 g sont nécessaires.

Cette relation entre l'ALOP, l'objectif de performance et le plan d'échantillonnage permettant de respecter l'objectif permet également de déterminer le niveau de contamination maximal pouvant être détecté avec une probabilité de 95% par un plan d'échantillonnage et d'évaluer le niveau de protection des consommateurs lié à ce plan.

Ainsi, un plan d'échantillonnage basé sur l'analyse systématique des mēlées avec $n=1$, absence dans 25 g, pour $b \geq 1$, permet de détecter à 95% des mēlées dont la contamination est supérieure ou égale à 0,8 ufc/g. Le niveau de protection estimé, associé à cette situation, est de 1 cas/3 000 portions.

Avec $n=3$, $c=0$, m =absence dans 25 g, pour $b \geq 1$, le plan permet de détecter à 95% des mēlées contaminées à un niveau supérieur ou égale à 0,08 ufc/g. Le niveau de protection estimé, associé à cette situation, est de 1 cas/30 000 portions. Le plan $n=1$, absence dans 75 g a des performances équivalentes.

Tableau 13. Nombre d'échantillons de 25 g à analyser pour détecter avec une probabilité de 95% les mêlées pouvant provoquer des cas, pour trois valeurs de b , en fonction du niveau de protection (ALOP) souhaité

b	0,5						1						1,5					
ALOP¹ (log₁₀)	-3	-3,5	-4	-4,5	-5	-6	-3	-3,5	-4	-4,5	-5	-6	-3	-3,5	-4	-4,5	-5	-6
N (25g)	2	2	3	4	8	51	1	1	2	3	7	50	1	1	2	3	6	49

¹. A titre d'exemple un ALOP à l'échelle log₁₀ de -3 correspond à 1 cas pour 1000 portions

Selon le modèle, un plan d'échantillonnage basé sur l'analyse systématique des mêlées avec $n=1$, absence dans 25 g, pour $b \geq 1$, permet de détecter à 95% des mêlées dont la contamination est supérieure ou égale à 1 ufc/g. Le niveau de protection estimé, associé à cette situation, est de 1 cas/3 000 portions.

Avec $n=3$, absence dans 25 g, pour $b \geq 1$, le plan permet de détecter à 95% des mêlées contaminées à un niveau supérieur ou égal à 0,1 ufc/g. Le niveau de protection estimé, associé à cette situation, est de 1 cas/30 000 portions. Le plan $n=1$, absence dans 75g a des performances équivalentes.

Ces résultats de niveau de risque sont conditionnels aux pratiques de cuisson considérées dans ce modèle. Un mode de cuisson plus adapté aux jeunes enfants permettrait une réduction significative du risque (Anses 2015).

3.4.6. Evaluation des niveaux de contamination des mêlées encadrantes

Les mêlées détectées positives avec un échantillonnage simple ($n=1$) donnent lieu à des investigations renforcées ($n=30$) sur les mêlées encadrantes. Si un échantillonnage systématique des mêlées est réalisé ($n=1$), la question se pose de la pertinence de réaliser un échantillonnage renforcé sur les mêlées encadrant chaque mêlée positive et dans lesquelles des EHEC n'ont pas été détectées.

Afin d'évaluer le niveau de risque associé à ces mêlées encadrantes, une modélisation du processus de fabrication de mêlées à partir de plusieurs unités de VPH est proposée. Ce processus, quoique simplifié, s'inspire des données collectées dans les réponses aux questionnaires d'audition des professionnels.

Il est donc fait l'hypothèse que les mêlées sont fabriquées à partir de plusieurs unités de VPH. Dans la pratique, ces unités de VPH sont constituées de morceaux avec des taux en matières grasses différents. Plusieurs unités de VPH réfrigérées et congelées peuvent être également associées dans une même mêlée. Il est également fait l'hypothèse qu'une quantité de matière est passée d'une mêlée à sa suivante (1/1000 de la masse de la mêlée).

À des fins d'évaluation du statut des mêlées encadrantes, on retient la situation suivante : chaque mêlée comporte trois types de VPH de nature différente (réfrigérées « grasses » R-G, réfrigérées « maigres » R-M, et congelées C) (Figure 12). Chaque mêlée contient donc entre 3 à 6 unités de VPH différentes (Figure 12).

50 000 mêlées produites selon ce scénario ont été simulées à partir d'unités de VPH pour la période de plus forte prévalence chez les bovins. Les niveaux de contamination des mêlées encadrantes de chaque mêlée détectée positive lors du contrôle systématique ont été comparés aux niveaux de contamination des mêlées éloignées des mêlées positives (au moins 5 mêlées antérieures ou postérieures).



Figure 12. Description de la composition des mêlées à partir de 3 type de VPH (R-G réfrigérées « gras », R-M réfrigérées « maigres » et C congelées).

Le scénario de fabrication retenu implique un mélange de plusieurs VPH, le corollaire est qu'une unité de VPH rentre dans la composition de plusieurs mêlées. Ce dernier point conduit à une dépendance des niveaux de contamination entre les mêlées. La figure 13 illustre ce lien.

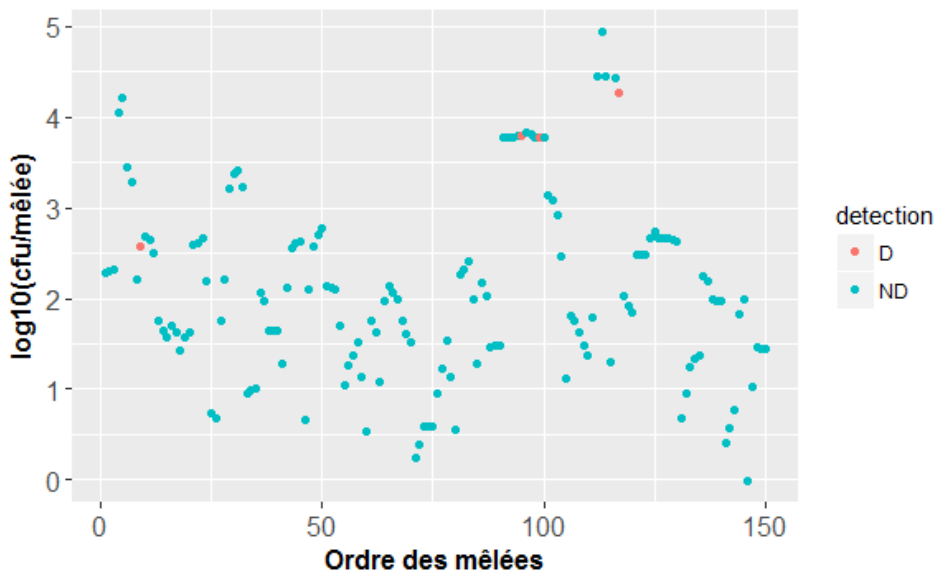


Figure 13. Niveaux de contamination de 150 mêlées (de 1000 kg) successives fabriquées à partir de trois types de VPH. Les points rouges indiquent une détection positive de EHEC dans le cadre d'un échantillonnage systématique des mêlées (n=1, m=25 g).

On constate que les mêlées fortement contaminées sont associées par paire ou par série plus longue. Les premières correspondent à un apport de la contamination par un lot de VPH réfrigérées « gras » ou « maigres » qui rentrent généralement dans la composition de deux mêlées (compte-tenu de leur part relative, de la taille des VPH et des mêlées). Les séries plus longues (par exemple mêlées 90 à 100 sur la

figure 13) correspondent à un apport par le VPH-C. Ce VPH rentrent dans la composition de dix mêlées en moyenne.

Le scénario aboutit à 2,7% de mêlées détectées positives dans le cas d'un échantillonnage systématique (période de plus forte excrétion). Il est à noter que les probabilités de détection des mêlées les plus fortement contaminées restent relativement faibles. La figure 14 illustre ce point. Pour ces 150 premières mêlées les probabilités de détection ne dépassent pas 0,65. Dans cette gamme de probabilités, deux mêlées présentant des niveaux de contamination équivalents ont une chance sur deux d'être détectées.

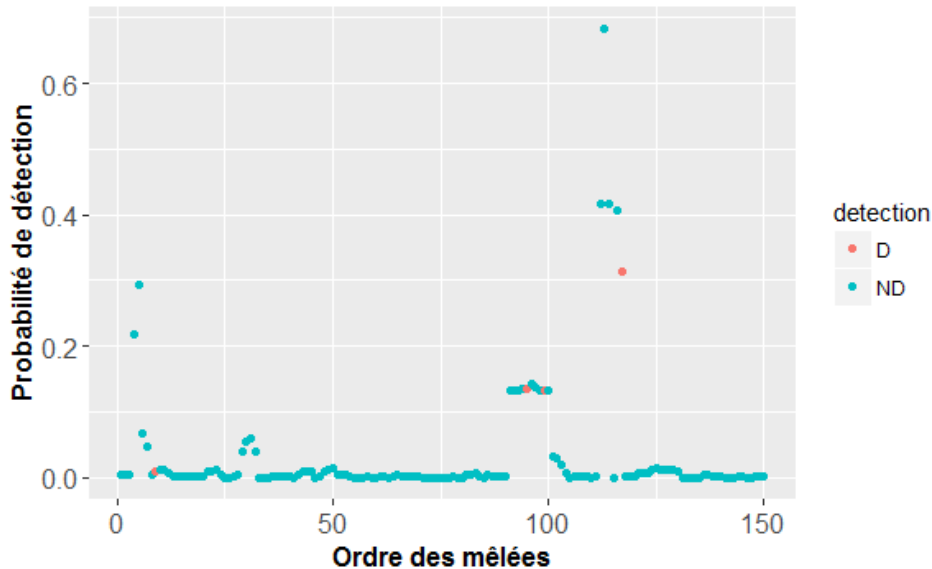


Figure 14. Probabilité de détection de 150 mêlées successives (de 1000 kg) fabriquées à partir de trois types de VPH. Les points rouges indiquent une détection positive d'EHEC dans le cadre d'un échantillonnage systématique des mêlées ($n=1$, $m=25$ g).

La distribution cumulative du nombre d'EHEC dans les mêlées positives est présentée sur la figure 15. Compte-tenu du processus de fabrication dans le scénario testé, les niveaux de contamination des mêlées directement encadrantes sont proches des mêlées détectées positives dans le cadre d'un échantillonnage systématique $n=1$, $m=25$ g. Les niveaux de contamination de ces mêlées encadrantes se distinguent clairement des mêlées plus éloignées (précédent ou suivant d'au minimum 5 mêlées), pour lesquelles la contamination médiane est 100 fois inférieure.

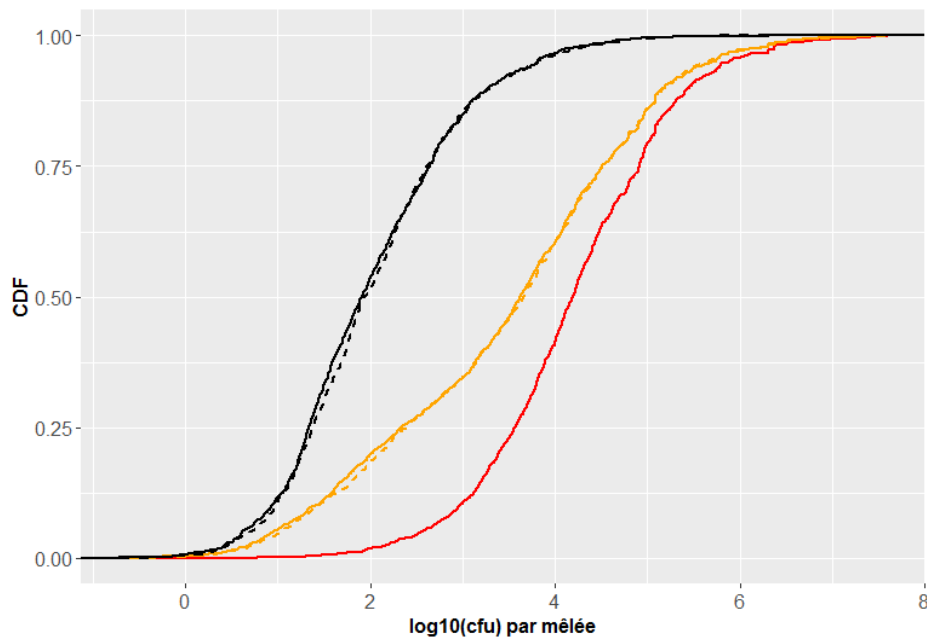


Figure 15. Distributions cumulatives (CDF) des niveaux de contamination de différentes mêlées. Rouge= répartition pour les mêlées positives dans le cadre de l'échantillonnage systématique. Orange= répartition pour les mêlées encadrantes (directement précédent --, ou suivant -). Noir = répartition des mêlées éloignées d'au moins 5 mêlées des mêlées positives dans le cadre de l'échantillonnage systématique.

Un échantillonnage renforcé (n=30) sur les mêlées directement encadrantes (m-1 et m+1) montre que la probabilité de détection dans ces mêlées est de 66%. Les résultats obtenus par modélisation du processus sont similaires aux données collectées auprès des professionnels.

L'échantillonnage des mêlées encadrantes est donc important à maintenir pour la maîtrise du risque. L'échantillonnage de ces mêlées encadrantes ne peut être écarté que si les mêlées encadrantes ne partagent pas les mêmes lots de VPH et qu'une procédure de nettoyage-désinfection validée garantit l'absence de contamination croisée entre les mêlées.

3.4.7. Efficacité d'une stratégie de prévention incluant des contrôles sur les matières premières

L'avis de l'Agence du 6 mai 2014 conclut que l'application d'un critère microbiologique (n=1, absence dans 25g) sur les mêlées a une efficacité supérieure à celui proposé pour les VPH (n=4, c=0, m= absence dans 75g). Pour atteindre des niveaux de réduction de risques comparables à ceux estimés selon un critère « Mêlée », l'analyse des VPH devrait porter sur un nombre très élevé d'échantillons, comparable à ce qui est préconisé aux Etats-Unis (60 échantillons de 6,25 g prélevés par lot de VPH) (FSIS 2014).

Les nouvelles connaissances acquises depuis 2014 ne sont pas de nature à modifier la conclusion de l'avis du 6 mai 2014. Les informations collectées montrent une très grande variabilité de pratiques des opérateurs et ne permettent pas de proposer un protocole d'analyse des matières premières qui serait applicable à toutes les situations. En tout état de cause, une approche intégrée de prévention et de la maîtrise des EHEC tout au long de la chaîne alimentaire (incluant des mesures d'hygiène et le contrôle des matières premières) devrait contribuer à la réduction du risque de SHU.

3.5. Conclusions du CES BIORISK

Le CES BIORISK émet les conclusions suivantes en réponse aux questions de la saisine :

➤ **Revue de la définition des souches STEC potentiellement hautement pathogènes de l'avis de l'Afssa du 27 mai 2010**

Toute souche d'*E. coli* isolée chez l'Homme ou dans les aliments devrait être considérée comme une EHEC si elle possède les gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* et *eae* ou d'autre(s) gène(s) codant un système d'adhésion au tube digestif de l'Homme.

Certains sérotypes d'EHEC sont plus fréquemment associés à une maladie grave (SHU). L'approche retenue est d'actualiser la classification proposée par le panel BIOHAZ de l'EFSA en 2013, en se fondant sur les données épidémiologiques françaises et européennes (2011-2015). Le CES BIORISK propose ainsi d'inclure le sérotype O80, troisième sérotype isolé dans le cas de SHU en France, dans le groupe I des EHEC à risque élevé (cf. tableau 6) ;

Le CES BIORISK souligne toutefois que la source du sérotype O80:H2 devrait être identifiée avant toute introduction de ce sérotype dans la liste des souches d'EHEC à rechercher dans le cadre des autocontrôles. De même, au regard des données disponibles sur la contamination du réservoir bovin, la recherche du sérotype O104:H4 dans les produits d'origine bovine ne paraît pas pertinente.

La liste des cinq sérotypes d'EHEC à rechercher en priorité dans les aliments demeure valide : O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28, et O111:H8. Pour cette recherche, il est recommandé d'utiliser les méthodes analytiques les plus sensibles.

Cette liste pourra être révisée en fonction de nouvelles données épidémiologiques, et en particulier des résultats des investigations en cours concernant la source du sérotype O80:H2.

➤ **Evaluation du pouvoir pathogène des souches *stx-* *eae+* appartenant à l'un des 5 sérotypes majeurs et isolées d'un bouillon de culture positif pour *stx***

La mise en œuvre de la méthode de recherche des EHEC dans les aliments lors d'analyses officielles conduit parfois à l'isolement de souches *stx-* *eae+* à partir d'un bouillon d'enrichissement d'un aliment dans lequel un gène *stx* a été détecté par PCR. De telles souches *stx-* *eae+* sont des EPEC⁶ (*E. coli* entéropathogènes). Ces souches, présentant toutes les caractéristiques génétiques des EHEC à l'exception des gènes *stx*, pourraient être le témoin de la présence d'un EHEC dans l'aliment, dont elles dériveraient après la perte de leur prophage Stx, soit dans l'aliment, soit durant leur isolement.

Des travaux récents montrent que l'induction de prophages Stx à l'origine d'une production de particules phagiques et de la lyse d'une partie de la population d'EHEC est possible *in vitro* dans des bouillons d'enrichissement et dans des matrices alimentaires. Toutefois, la transformation d'EHEC en EPEC au cours de ce phénomène d'induction serait un événement rare qui demeure encore mal connu à l'heure actuelle. L'acquisition d'un prophage Stx par un *E. coli* (qui conduirait à l'obtention d'un EHEC) semble également constituer un événement rare ou qui n'aboutit pas au maintien stable du génome phagique dans le chromosome bactérien.

Sans confirmation par l'isolement de la souche, l'obtention d'un bouillon positif pour *stx* et un des types d'intimine (*eae*) des 5 principaux sérotypes d'EHEC, est le signe de la présence potentielle d'un EHEC. Si la souche isolée est *stx-*, elle ne peut pas être considérée comme une EHEC. Néanmoins, l'interprétation des résultats doit tenir compte du contexte épidémiologique dans lequel le prélèvement a été effectué ainsi que de la sensibilité et de la spécificité des méthodes analytiques utilisées.

⁶ Ces souches étaient appelées « AECC » dans l'avis de l'Anses n°2010-SA-0031.

➤ **Revue des données disponibles relatives aux concentrations en STEC dans les aliments et les eaux à l'origine d'épidémies**

Les pratiques de préparation des viandes, la quantité d'aliment ingéré, la taille des lots contaminés, la sensibilité des personnes exposées sont autant de facteurs qui contribuent (avec les niveaux de contamination) à la survenue de cas d'infection à EHEC associés à un lot de fabrication.

Les données récentes ne permettent ni de remettre en cause ni d'améliorer la relation dose-réponse qui prend le mieux en compte la population d'intérêt de la présente saisine, c'est-à-dire les enfants de moins de 15 ans.

Il n'existe pas de concentration seuil en-dessous de laquelle il n'y aurait jamais d'épidémie. Pour une population sensible donnée (par exemple les enfants de moins de 15 ans) dont on connaîtrait la consommation annuelle ainsi que les pratiques de préparation des aliments considérés et donc l'exposition au danger, il est néanmoins possible d'estimer :

- le nombre annuel de cas et son incertitude,
- si un risque acceptable (ou niveau approprié de protection sanitaire – Appropriate Level of Protection/ALOP) est indiqué par le gestionnaire du risque, une dose telle que la probabilité de ne pas respecter ce risque acceptable ne dépasse pas 1% ou toute autre valeur fixée par le gestionnaire du risque, et l'incertitude autour de cette probabilité.

L'expertise réalisée a donc porté sur la prévention des cas de SHU dans leur totalité (cas sporadiques et épidémies).

➤ **Modélisation de la contamination des matières premières et des mêlées de viande hachée et évaluation de l'impact des mesures de gestion sur la réduction du risque de SHU**

La modélisation effectuée avait pour objectif d'estimer et de comparer l'efficacité de différents plans d'échantillonnage et mesures de gestion proposés sur la réduction de la probabilité de survenue de cas de SHU liés à la consommation de steaks hachés de bœuf. Le modèle utilise la prévalence des cinq sérotypes majeurs pour l'évaluation des risques.

- **Efficacité des plans d'échantillonnage proposés et impact sur la réduction du risque de SHU**

Selon le modèle, la proportion attendue de mêlées détectées varie de 2% à 6% en période de forte excrétion et de 0,04% à 0,13% en période de faible excrétion. La comparaison des plans d'échantillonnage montre une réduction du risque suite à l'application des 3 plans considérés. Cette réduction du risque est plus importante en période de forte excrétion (92- 98%) par rapport à la période de faible excrétion (57 – 87%).

Compte tenu des incertitudes du modèle, les différences de réductions observées entre les 3 plans ne sont pas significatives. En période de forte excrétion, le plan « n=1, m= absence des 5 sérotypes dans 25 g » permettrait, s'il était appliqué sur toutes les mêlées produites, de diviser par 10 le risque de SHU par steak haché.

Selon le modèle, un plan d'échantillonnage basé sur l'analyse systématique des mêlées avec n=1, absence des 5 sérotypes dans 25 g, pour $b \geq 1$, permet de détecter à 95% des mêlées dont la contamination est supérieure ou égale à 1 ufc/g. Le plan n=3, absence dans 25 g, pour $b \geq 1$, permet de détecter à 95% des mêlées contaminées à un niveau supérieur ou égale à 0,1 ufc/g. Le plan n=1, absence dans 75g a des performances équivalentes.

Pour atteindre les niveaux de performance calculés dans cet avis, le critère microbiologique doit inclure les 5 sérotypes majeurs et être appliqué à toutes les mêlées. Selon les informations transmises par les professionnels, la grande majorité des analyses réalisées portent uniquement sur le sérotype O157:H7.

- **Evaluation des niveaux de contamination des mêlées encadrantes**

La modélisation effectuée montre que les mêlées fortement contaminées sont associées par paire ou par série plus longue. Un échantillonnage renforcé (n=30) sur les mêlées directement encadrantes (m-1 et m+1)

montre que la probabilité de détection dans ces mêlées est de 66%. Ces résultats obtenus par modélisation du processus sont similaires aux données collectées auprès des professionnels.

L'échantillonnage des mêlées encadrantes est donc important à maintenir pour la maîtrise du risque. L'échantillonnage de ces mêlées encadrantes ne peut être écarté que si les mêlées encadrantes ne partagent pas les mêmes lots de VPH et qu'une procédure de nettoyage-désinfection validée garantit l'absence de contamination croisée entre les mêlées.

- **Efficacité d'une stratégie de prévention incluant des contrôles sur les matières premières**

Les nouvelles connaissances acquises depuis 2014 ne sont pas de nature à modifier l'avis de l'Anses du 6 mai 2014 qui concluait à une meilleure efficacité d'un critère microbiologique appliqué aux mêlées plutôt qu'aux VPH. Pour atteindre des niveaux de réduction de risques comparables à ceux estimés selon un critère « Mêlée », l'analyse des VPH devrait porter sur un nombre très élevé d'échantillons, comparable à ce qui est préconisé aux Etats-Unis (60 échantillons de 6,25g prélevés par lot de VPH) (FSIS 2014).

En tout état de cause, une approche intégrée de prévention et de la maîtrise des EHEC tout au long de la chaîne alimentaire (incluant des mesures d'hygiène et le contrôle des matières premières) devrait contribuer à la réduction du risque de SHU. Enfin, un mode de cuisson des steaks hachés plus adapté aux jeunes enfants permettrait une réduction significative du risque (Anses 2015).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

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

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC) ; *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) ; plan d'échantillonnage ; viande hachée bovine ; Appréciation quantitative du risque.

Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) ; *shigatoxin-producing E. coli* (STEC) ; Sampling plan ; ground bovine meat; Quantitative risk assessment.

BIBLIOGRAPHIE

- Afssa. 2008. "Avis du 15 juillet 2008 relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme."
- Afssa. 2010. "Avis du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008."
- Anses. 2014. "AVIS du 6 mai 2014 relatif à la définition d'un plan d'échantillonnage pour la détection d'*E. coli* O157 : H7 dans le cadre des autocontrôles en filière viande hachée bovine "
- Anses. 2015. "AVIS et rapport de l'Anses du 14 octobre 2015 relatif à l'information des consommateurs en matière de prévention des dangers biologiques - Tome 2 – Evaluation de l'efficacité des stratégies de communication."
- Auvray, F., F. Dilasser, D. Bibbal, M. Kérourédan, E. Oswald, et H. Brugère. 2012. "French cattle is not a reservoir of the highly virulent enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4." *Veterinary Microbiology* 158 (3-4):443-445. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.029.
- Barkocy-Gallagher, G. A., T. M. Arthur, M. Rivera-Betancourt, X. Nou, S. D. Shackelford, T. L. Wheeler, et M. Koohmaraie. 2003. "Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants." *J Food Prot* 66 (11):1978-86.
- Bergis, H., M. Cornu, V. Zuliani, I. Albert, et J.-B. Denis. 2009. Impact des pratiques de cuisson sur les risques microbiens alimentaires. Rapport AFSSA/IFIP/INRA
- Bibbal, D., E. Loukiadis, M. Kerouredan, F. Ferre, F. Dilasser, C. Peytavin de Garam, P. Cartier, E. Oswald, E. Gay, F. Auvray, et H. Brugère. 2015. "Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France." *Appl Environ Microbiol* 81 (4):1397-1405. doi: 10.1128/AEM.03315-14.
- Bielaszewska, M., R. Prager, R. Kock, A. Mellmann, W. Zhang, H. Tschape, P. I. Tarr, et H. Karch. 2007. "Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans." *Appl Environ Microbiol* 73 (10):3144-50. doi: 10.1128/aem.02937-06.
- Bonanno, L. 2016. "Rôle des phages Stx dans la diversité des souches d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine (STEC) O26:H11 isolées de produits alimentaires : étude du polymorphisme et de la mobilité des gènes stx. ." Thèse de doctorat, Université Paris Est.
- Bonanno, L., E. Cherchame, V. Michel, et D. Albert. 2016. "Evaluation of food diagnostic methods on Stx bacteriophages induction and isolation efficiency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)." Food Micro Dublin, Irlande.
- Bonanno, L., B. Delubac, V. Michel, et F. Auvray. 2017. "Influence of Stress Factors Related to Cheese-Making Process and to STEC Detection Procedure on the Induction of Stx Phages from STEC O26:H11." *Front Microbiol* 8:296. doi: 10.3389/fmicb.2017.00296.
- Bonanno, L., E. Loukiadis, P. Mariani-Kurkdjian, E. Oswald, L. Garnier, V. Michel, et F. Auvray. 2015. "Diversity of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 Strains Examined via stx Subtypes and Insertion Sites of Stx and EspK Bacteriophages." *Appl Environ Microbiol* 81 (11):3712-21. doi: 10.1128/aem.00077-15.
- Bonanno, L., M. A. Petit, E. Loukiadis, V. Michel, et F. Auvray. 2016. "Heterogeneity in Induction Level, Infection Ability, and Morphology of Shiga Toxin-Encoding Phages (Stx Phages) from Dairy and

- Human Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26:H11 Isolates." *Appl Environ Microbiol* 82 (7):2177-86. doi: 10.1128/aem.03463-15.
- Bruyand, M., P. Mariani-Kurkdjian, S. Bonacorsi, M. Gouali, S. Le Hello, D. Van Cauteren, et H. de Valk. 2016. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2015.
- Bruyand, M., P. Mariani-Kurkdjian, M. Gouali, D. Van Cauteren, et H. de Valk. 2015. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2014.
- Buvsen, Glenn, Björn Possé, Koen De Schrijver, Lieven De Zutter, Sabine Lauwers, et Denis Piérard. 2011. "Virulence profiling and quantification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O145: H28 and O26: H11 isolated during an ice cream-related hemolytic uremic syndrome outbreak." *Foodborne Pathogens and Disease* 8 (3):421-426.
- Cabal, A., L. Geue, S. Gomez-Barrero, S. Barth, C. Barcena, K. Hamm, M. C. Porrero, A. Valverde, R. Canton, C. Menge, C. Gortazar, L. Dominguez, et J. Alvarez. 2015. "Detection of virulence-associated genes characteristic of intestinal *Escherichia coli* pathotypes, including the enterohemorrhagic/enteroaggregative O104:H4, in bovines from Germany and Spain." *Microbiol Immunol* 59 (8):433-42. doi: 10.1111/1348-0421.12275.
- Callejón, Raquel M., M. Isabel Rodríguez-Naranjo, Cristina Ubeda, Ruth Hornedo-Ortega, M. Carmen Garcia-Parrilla, et Ana M. Troncoso. 2015. "Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes." *Foodborne Pathogens and Disease* 12 (1):32-38. doi: 10.1089/fpd.2014.1821.
- Cartier, P. 2009. Traitement des carcasses bovines par "steam vacuum" en cours d'abattage - Compte rendu final Programme d'étude Interbev.
- Cassin, M. H., A. M. Lammerding, E. C. Todd, W. Ross, et R. S. McColl. 1998. "Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers." *Int J Food Microbiol* 41 (1):21-44.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2016. CDC's OutbreakNet Foodborne Outbreak Online Database. <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>.
- Colon, M. P., D. Chakraborty, Y. Pevzner, et G. B. Koudelka. 2016. "Mechanisms that Determine the Differential Stability of Stx(+) and Stx(-) Lysogens." *Toxins (Basel)* 8 (4):96. doi: 10.3390/toxins8040096.
- Cummins, E., P. Nally, F. Butler, G. Duffy, et S. O'Brien. 2008. "Development and validation of a probabilistic second-order exposure assessment model for *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef trimmings from Irish meat plants." *Meat Sci* 79 (1):139-54. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.08.015.
- Delignette-Muller, M. L., et M. Cornu. 2008. "Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households." *International Journal of Food Microbiology* 128 (1):158-164.
- EFSA, et ECDC. 2015a. "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013." *EFSA Journal* 13 (1):3991-n/a. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3991.
- EFSA, et ECDC. 2015b. "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014." *EFSA Journal* 13 (12):4329-n/a. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
- EFSA, et ECDC. 2016. "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015." *EFSA Journal* 14 (12):e04634-n/a. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
- EFSA BIOHAZ Panel, (Efsa Panel on Biological Hazards). 2013. "Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment." *EFSA Journal* 11 (4):3138-n/a. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3138.
- EFSA BIOHAZ Panel, (Efsa Panel on Biological Hazards). 2015. "Public health risks associated with Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen." *EFSA Journal* 13 (12):4330-n/a. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4330.
- Farrokh, Choreh, Kieran Jordan, Frederic Auvray, Kathleen Glass, Hanne Oppegaard, Sabrina Raynaud, Delphine Thevenot, Robin Condron, Koen De Reu, et Alexander Govaris. 2013. "Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production." *International Journal of Food Microbiology* 162 (2):190-212.

- FSIS. 2014. FSIS Compliance Guideline for Establishments Sampling Beef Trimmings for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Organisms or Virulence Markers.
- Gill, Alexander, et George Huszczynski. 2016. "Enumeration of *Escherichia coli* O157: H7 in Outbreak-Associated Beef Patties." *Journal of Food Protection* 79 (7):1266-1268.
- Gill, Alexander, et Denise Oudit. 2015. "Enumeration of *Escherichia coli* O157 in outbreak-associated Gouda cheese made with raw milk." *Journal of Food Protection* 78 (9):1733-1737.
- Goswami, K., C. Chen, L. Xiaoli, K. A. Eaton, et E. G. Dudley. 2015. "Coculture of *Escherichia coli* O157:H7 with a Nonpathogenic *E. coli* Strain Increases Toxin Production and Virulence in a Germfree Mouse Model." *Infect Immun* 83 (11):4185-93. doi: 10.1128/iai.00663-15.
- Hara-Kudo, Y., et K. Takatori. 2011. "Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections." *Epidemiology and Infection* 139 (10):1505-1510. doi: 10.1017/S095026881000292X.
- Imamovic, L., E. Balleste, A. Martinez-Castillo, C. Garcia-Aljaro, et M. Muniesa. 2016. "Heterogeneity in phage induction enables the survival of the lysogenic population." *Environ Microbiol* 18 (3):957-69. doi: 10.1111/1462-2920.13151.
- Iversen, H., L' Abee-Lund TM, M. Aspholm, L. P. Arnesen, et T. Lindback. 2015. "Commensal *E. coli* Stx2 lysogens produce high levels of phages after spontaneous prophage induction." *Front Cell Infect Microbiol* 5:5. doi: 10.3389/fcimb.2015.00005.
- Jaloustre, S. 2011. "Appréciation quantitative des risques pour l'évaluation de mesures de maîtrise sanitaire dans une filière agro alimentaire. Application à *Clostridium perfringens* en restauration hospitalière. PhD thesis available at: <http://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00781728/>." AgroParisTech.
- King, L., M. Gouali, P. Mariani-Kurkdjian, et V. Vaillant. 2013. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2012.
- King, L., M. Macé, P. Mariani-Kurkdjian, M. Gouali, et V. Vaillant. 2012. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2011.
- King, L., P. Mariani-Kurkdjian, M. Gouali, et V. Vaillant. 2014. "Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2013."
- Loukiadis, E., et C. Mazuy-Cruchaudet. 2013. Plan de surveillance 2012 de la contamination par *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) des viandes hachées de boeuf surgelées au stade de la production.
- Loukiadis, E., et C. Mazuy-Cruchaudet. 2014. Plan de surveillance 2013 de la contamination par *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) des minerais de boeuf et des viandes hachées de boeuf, au stade de la production.
- Loukiadis, E., C. Mazuy-Cruchaudet, et F. Ferre. 2012. Plan de surveillance 2011 de la contamination par *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) des viandes hachées de boeuf surgelées au stade de la production.
- Loukiadis, Estelle , Hélène Callon, Christine Mazuy-Cruchaudet, Valérie Vallet, Christine Bidaud, Franck Ferré, Laurence Giuliani, Laurine Bouteiller, Nathalie Pihier, et Corinne Danan. 2012. "Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011)." *Bulletin épidémiologique santé animale - alimentation* 55:4-9.
- Loukiadis, Estelle, Clémence Bièche-Terrier, Catherine Malayrat, Franck Ferré, Philippe Cartier, et Jean-Christophe Augustin. 2017. "Distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef: Assessing the clustering intensity for an industrial-scale grinder and a low and localized initial contamination." *International Journal of Food Microbiology*. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.009>.
- Loukiadis, Estelle, C. Mazuy-Cruchaudet, A. Granjon, S. Félix, MP. Donguy, S. Rémy, S. Itié-Hafez, et C. Danan. 2017. "Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les viandes hachées de boeuf réfrigérées mises sur le marché en France en 2015." *Bulletin épidémiologique santé animale - alimentation* 77:5.
- Lu, X., Q. Liu, D. Wu, H. M. Al-Qadiri, N. I. Al-Alami, D. H. Kang, J. H. Shin, J. Tang, J. M. Jabal, E. D. Aston, et B. A. Rasco. 2011. "Using of infrared spectroscopy to study the survival and injury of *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* and *Pseudomonas aeruginosa* under cold stress in low nutrient media." *Food Microbiol* 28 (3):537-46. doi: 10.1016/j.fm.2010.11.002.
- Mariani-Kurkdjian, P., S. Delannoy, P. Fach, S. Ganet, et E. Loukiadis. 2014. Etude des caractéristiques génétiques et phénotypiques des souches STEC isolées en France, chez l'homme, l'animal et les aliments.
- Muniesa, M., J. E. Blanco, M. De Simon, R. Serra-Moreno, A. R. Blanch, et J. Jofre. 2004. "Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle." *Microbiology* 150 (Pt 9):2959-71. doi: 10.1099/mic.0.27188-0.

- Neto, M., S. Delannoy, F. Auvray, E. Oswald, P. Fach, et E. Loukiadis. 2012. "Public Health Significance of *E. coli* O26 Isolated from Foodstuffs: Toward Genetic Predictors of Their Virulence." *Zoonoses and Public Health* 59:19-90 (P036). doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01512.x.
- Paddock, Z. D., J. Bai, X. Shi, D. G. Renter, et T. G. Nagaraja. 2013. "Detection of *Escherichia coli* O104 in the feces of feedlot cattle by a multiplex PCR assay designed to target major genetic traits of the virulent hybrid strain responsible for the 2011 German outbreak." *Appl Environ Microbiol* 79 (11):3522-5. doi: 10.1128/aem.00246-13.
- Perrin, Frédérique, Fanny Tenenhaus-Aziza, Valérie Michel, Stéphane Miszczycha, Nadège Bel, et Moez Sanaa. 2015. "Quantitative Risk Assessment of Haemolytic and Uremic Syndrome Linked to O157:H7 and Non-O157:H7 Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* Strains in Raw Milk Soft Cheeses." *Risk Analysis* 35 (1):109-128.
- Schmidt, H., M. Bielaszewska, et H. Karch. 1999. "Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7." *Appl Environ Microbiol* 65 (9):3855-61.
- Sergentet, D., C. Mazuy-Cruchaudet, et M. Ruez. 2015. "Plan de surveillance de la contamination des fromages au lait cru par *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) au stade de la production – 2014."
- Shridhar, Pragathi B., Lance W. Noll, Xiaorong Shi, Natalia Cernicchiaro, David G. Renter, J. Bai, et T. G. Nagaraja. 2016. "*Escherichia coli* O104 in Feedlot Cattle Feces: Prevalence, Isolation and Characterization." *PLOS ONE* 11 (3):e0152101. doi: 10.1371/journal.pone.0152101.
- Smith, Ben A., Aamir Fazil, et Anna M. Lammerding. 2013. "A risk assessment model for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and beef cuts in Canada: Evaluating the effects of interventions." *Food Control* 29 (2):364-381. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.003>.
- Soysal, N., P. Mariani-Kurkdjian, Y. Smail, S. Liguori, M. Gouali, E. Loukiadis, P. Fach, M. Bruyand, J. Blanco, P. Bidet, et S. Bonacorsi. 2016. "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hybrid Pathotype O80:H2 as a New Therapeutic Challenge." *Emerg Infect Dis* 22 (9):1604-12. doi: 10.3201/eid2209.160304.
- Stephens, T. P., T. A. McAllister, et K. Stanford. 2009. "Perineal swabs reveal effect of super shedders on the transmission of *Escherichia coli* O157:H7 in commercial feedlots." *J Anim Sci* 87 (12):4151-60. doi: 10.2527/jas.2009-1967.
- Strachan, Norval J. C., Michael P. Doyle, Fumiko Kasuga, Ovidiu Rotariu, et Iain D. Ogden. 2005. "Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks." *International Journal of Food Microbiology* 103 (1):35-47. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.023>.
- Teunis, PFM, ID Ogden, et NJC Strachan. 2008. "Hierarchical dose response of *E. coli* O157:H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure." *Epidemiology and Infection* 136 (06):761-770.
- Toth, I., H. Schmidt, M. Dow, A. Malik, E. Oswald, et B. Nagy. 2003. "Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system." *Appl Environ Microbiol* 69 (12):7242-7.
- Tozzoli, R., L. Grande, V. Michelacci, P. Ranieri, A. Maugliani, A. Caprioli, et S. Morabito. 2014. "Shiga toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia coli*: a world in motion." *Front Cell Infect Microbiol* 4:80. doi: 10.3389/fcimb.2014.00080.
- Tuttle, J, T Gomez, MP Doyle, JG Wells, T Zhao, RV Tauxe, et PM Griffin. 1999. "Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties." *Epidemiology and Infection* 122 (2):185-192.
- Wieler, L. H., T. Semmler, I. Eichhorn, E. M. Antao, B. Kinnemann, L. Geue, H. Karch, S. Guenther, et A. Bethe. 2011. "No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area." *Gut Pathog* 3 (1):17. doi: 10.1186/1757-4749-3-17.

ANNEXE 1 : PRESENTATION DES INTERVENANTS

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

RAPPORTEURS

M. Frederic AUVRAY - Anses, Laboratoire de sécurité des aliments. Caractérisation moléculaire et détection des *E. coli* pathogènes

M. Olivier CERF – Professeur émérite. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. Evaluation des risques microbiologiques, microbiologie des aliments

M. Laurent GUILLIER – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments. Modélisation, appréciation quantitative des risques, microbiologie des aliments

Mme Patricia MARIANI - Laboratoire associé au CNR *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella*, CHU Robert Debré. Infectiologie clinique, *E. coli*

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

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

■ CES « Evaluation des risques biologiques des aliments » (BIORISK)

Président

Mme Isabelle VILLENA – CHU Reims. Parasitologie, infectiologie

Membres

M. Jean-Christophe AUGUSTIN – Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. Modélisation, appréciation quantitative des risques, microbiologie des aliments

Mme Anne BRISABOIS – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments. Microbiologie des aliments, écologie microbienne, méthodes analytiques

M. Olivier CERF – Professeur émérite. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. Evaluation des risques microbiologiques, microbiologie des aliments

M. Pierre COLIN – Professeur émérite. Université de Bretagne Occidentale. Hygiène et microbiologie des aliments (viandes et produits carnés – volailles)

M. Philippe DANTIGNY – AgroSup Dijon. Mycologie, procédés de décontamination, écologie microbienne

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – AgroParisTech. Microbiologie des aliments, mécanismes d'adaptation au stress, biofilms, hygiène des surfaces et des procédés

M. Michel FEDERIGHI-ONIRIS, Nantes - Hygiène et microbiologie des aliments (viandes et produits carnés), procédés de décontamination

M. Benoit FOLIGNE – Faculté de pharmacie de Lille. Microbiote intestinal, interaction écosystème alimentaire/microbiote

Mme Florence FORGET-RICHARD – INRA. Mycotoxines, champignons filamenteux, biochimie, filières céréales

M. Philippe FRAVALO – Université de Montréal. Hygiène et microbiologie des aliments (viandes et produits carnés)

M. Pascal GARRY – Ifremer, Nantes. Hygiène et microbiologie des aliments (viandes et produits carnés, coquillages)

M. Michel GAUTIER – Agrocampus Ouest. Microbiologie des aliments, biologie moléculaire, génie génétique

M. Laurent GUILLIER – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments. Modélisation, appréciation quantitative des risques, microbiologie des aliments

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

M. Alexandre LECLERCQ – Institut Pasteur. Microbiologie des aliments (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia* entéropathogènes), méthodes phénotypiques et moléculaires

M. Simon LE HELLO – Institut Pasteur. *Salmonella*, épidémiologie, méthodes phénotypiques et moléculaires

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

Mme Nicole PAVIO – Anses, Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort. Virologie

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Université Montpellier 2. Mycologie, écologie microbienne

Mme Muriel THOMAS – INRA. Microbiote intestinal, probiotiques

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Pauline KOOH – Chef de projets scientifiques et techniques – Unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM) – Direction de l'évaluation des risques

Mme Nathalie ARNICH - adjointe au chef d'unité - UERALIM - Direction de l'évaluation des risques

Contribution scientifique

Mme Frédérique AUDIAT-PERRIN – Chargée de projets scientifiques et techniques – UERALIM – Direction de l'évaluation des risques

M. Moez SANAA - Chef d'unité - UERALIM – Direction de l'évaluation des risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Anses – Direction de l'Evaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Mme Clémence Bièche-Terrier - Institut de l'élevage

Mme Estelle LOUKIADIS - Laboratoire national de référence (LNR) *E. coli* y compris les *E. coli* producteurs de shigatoxines

Mme Fabienne NIGER - Fédération Nationale de l'Industrie et des Commerces en Gros des Viandes

Mme Nathalie VEAUCLIN - Culture Viandes

ANNEXE 2 : RESULTATS DES PLANS DE SURVEILLANCE DE LA CONTAMINATION DES EHEC DANS LES ALIMENTS EN FRANCE

- **Prévalence de contamination par des souches EHEC du top 5, des viandes de bœuf analysées en France au cours des plans de surveillance de 2006 à 2015** (Loukiadis *et al.* 2012, Loukiadis et Mazuy-Cruchaudet 2013, 2014, Loukiadis, Mazuy-Cruchaudet, *et al.* 2017)

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2013	2015
Type de produits	VHS	VHR	Minerais	VHR	VHR	VHS	VHS	Minerai	VHS	VHR
Stade chaîne alimentaire	P	P	P	D	D	P	P	P	P	D
Nombre positifs/nombre analysés	0/796	11/3605	10/992	2/1557	5/2476	9/1878	7/1923	6/495	2/496	1/296
Prévalence et Intervalle de confiance à 95 %	0 [0-0,4]	0,3 [0,2-0,6]	1 [0,5-1,9]	0,1 [0-0,5]	0,2 [0,1-0,5]	0,5 [0,2-0,9]	0,4 [0,1-0,7]	1,2 [0,45-2,62]	0,4 [0,05-1,45]	0,3 [0,01-1,9]

P : production ; D : Distribution

- **Sérotypes d'EHEC isolés dans les viandes de bœuf dans le cadre des plans de surveillance de 2006 à 2015**

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2013	2015	Total
Type de produits	VHS	VHR	Minerais	VHR	VHR	VHS	VHS	Minerai	VHS	VHR	
Stade chaîne alimentaire	P	P	P	D	D	P	P	P	P	D	
Nombre total de souches EHEC du top 5 dont	0	11	10	2	6	9	7	9	2	1	57
O157:H7		5	2	1	1	3	3	7	1		23
O26:H11		2	5			5	2	1	1		16
O103:H2		3	3	1	4	1		1		1	14
O145:H28		0	0		1						1
O111:H8		1	0								1

P : production D : Distribution

- **Prévalence de contamination par des souches EHEC du top 5, fromages au lait cru analysés en France au cours des plans de surveillance entre 2005 et 2014** (Loukiadis *et al.* 2012, Sergentet, Mazuy-Cruchaudet, et Ruez 2015)

Année	2005	2007	2009	2014
Type de produits	Fromages de chèvre frais au lait cru	Fromages au lait cru de vache, brebis et chèvre	Fromages au lait cru de vache, brebis et chèvre	Fromages au lait cru
Nombre positifs/nombre analysés	0/87	0/392	17/1 911	2/1045
Prévalence et Intervalle de confiance à 95 %	0 [0- 0,4]	0 [0- 0,9]	0,9 0,6-1,4]	0.19 [0.02-0.6]

- **Sérotypes d'EHEC isolés dans les fromages au lait cru dans le cadre des plans de surveillance entre 2005 et 2014**

Année	2005	2007	2009	2014
Type de produits investigués	Fromages de chèvre frais au lait cru	Fromages au lait cru de vache, brebis et chèvre	Fromages au lait cru de vache, brebis et chèvre	Fromages au lait cru
Nombre total de souches EHEC top 5 isolées dont	0	0	17	2
O157:H7			1	
O26:H11			11	2
O103:H2			4	
O145:H28			1	
O111:H8			0	

Avis de l'Anses

Saisine n° 2016-SA-0121

Saisines liées n°2013-SA-0223 ; 2010-SA-0031

ANNEXE 3 : PARAMETRES DU MODELE

Paramètres	Nature	Symbole	Unité	Valeur modèle Anses 2014	Valeur modèle Anses 2017	Référence
Prévalence de la contamination des fèces	F	P_f	%	3,9	$P_{f_{low}}=1,2$ $P_{f_{high}}=3,9$	Bibbal <i>et al.</i> (2015)
Ratio de transfert des fèces aux cuirs	V	$RT_{f_{cuir}}$	/	~log-Normale (3,193 ; 0,106)		Barkocy-Gallagher <i>et al.</i> (2003)
Concentration en EHEC dans les fèces	V	C_f	log ₁₀ UFC/g	~Normale (1,82 ; 2,43)	$C_{f_{low}} \sim$ Normale (1.59 ; 1.45) $C_{f_{high}} \sim$ Normale (2.44 ; 1.98)	Stephens, McAllister, et Stanford (2009)
Fraction de transfert des bactéries vers le cuir	V	$FT_{f_{cuir}}$	/	~Log-logistique (-3,77 ; 2,29 ; 10,3)		Smith, Fazil, et Lammerding (2013)
Ratio de transfert des cuirs vers la surface des carcasses	V	RT_{cuirC}	/	~Normale (0,237 ; 0,009)		Barkocy-Gallagher <i>et al.</i> (2003)
Fraction de transfert des bactéries du cuir vers la surface des carcasses	V	FT_{cuirC}	/	~Logistique (-1,97 ; 0,457)		Smith, Fazil, et Lammerding (2013)
Surface contaminée sur la carcasse	V	a	cm ²	~Triangulaire (log ₁₀ (30) ; log ₁₀ (300) ; log ₁₀ (3 000))	Equation 1	Cummins <i>et al.</i> (2008) Smith, Fazil, et Lammerding (2013)
Proportion de souillures « spot » provenant du cuir	F	P_{spot}	%	/	80	Cartier (2009)
Proportion de souillures « main » provenant du cuir	F	P_{main}	%	/	20	Cartier (2009)
Nombre moyen de souillures par carcasse	I	$m_{souillure}$		/	1 à 20 (10 par défaut)	
Surface d'un spot	F	S_{spot}	cm ²	/	7	Cartier (2009)
Surface d'une contamination étendue	F	S_{main}	cm ²	/	150	Cartier (2009)
Probabilité de détection/élimination d'un spot	I	D_{spot}	%	/	10 à 90 (50 par défaut)	
Probabilité de détection/élimination d'une souillure main	I	D_{main}	%	/	10 à 90 (80 par défaut)	
Surface contaminée corrigée sur la carcasse après détection et traitement	V	a_{corr}	cm ²	/	Equation 2	
Probabilité de rupture des viscères	V	Ex	%	Variable entre 0,1% et 1%		Cummins <i>et al.</i> (2008)
Quantité du contenu des viscères souillant la carcasse	V	q	g	~Uniforme (1 ; 50)	~Uniforme (1 ; 20)	Smith, Fazil, et Lammerding (2013)

Avis de l'Anses

Saisine n° 2016-SA-0121

Saisines liées n°2013-SA-0223 ; 2010-SA-0031

Paramètres	Nature	Symbole	Unité	Valeur modèle Anses 2014	Valeur modèle Anses 2017	Référence
Surface totale de la carcasse	F	TSA	cm ²	32 000		Smith, Fazil, et Lammerding (2013)
Nombre de carcasses par unité de minerai	F	nbc	/	Scénario 1 : 5 ; Scénario 2 : 60 ; Scénario 3 : 120	60	
Masse d'une unité de minerai/mêlée	F	T	kg	Scénario 1 : 50 ; Scénario 2 : 500 ; Scénario 3 : 1 000	700	
Masse d'un morceau j d'une carcasse i	V	M_{ij}	g	~Triangulaire (50, 500, 1 000)		Smith, Fazil, et Lammerding (2013)
Fraction des bactéries se trouvant dans les morceaux destinés à la fabrication des viandes hachées	V	F_{vhi}		~Uniforme (0,75 ; 0,90)		Smith, Fazil, et Lammerding (2013)
Coefficient d'hétérogénéité de l'unité de mêlée	I	b		Homogène : 1 000 ; Moyennement homogène : 1 ; Hétérogène : 0,1	0.5-2	Loukiadis, Bièche-Terrier, <i>et al.</i> (2017)
Masse d'une unité de VPH	F/V	T/M_{VPH}	kg	Scénario 1 : 50	1 000	
Masse d'une mêlée	F/V	T/M_M	kg	Scénario 2 : 500 Scénario 3 : 1000	1 000	
Masse d'un steak haché	F	M_{steak}	g	125g	100g	
Proportion de steaks hachés consommés par des enfants de moins de 15 ans	F	Pe		0,16		Anses (2015)
Probabilité de développement d'un SHU sachant l'infection	F	$P_{SHU Inf}$		0,10		Strachan <i>et al.</i> (2005)
Paramètre de la relation dose/réponse exponentielle	F	r		$1,13 \times 10^{-3}$	équation 12	Perrin <i>et al.</i> (2015)
Nombre de réduction décimale en fin de cuisson	V	RD		Voir tableau 1 avis Anses (2014)	Voir Tableau 9	Bergis <i>et al.</i> (2009)

ANNEXE 4 : INFLUENCE DES PARAMETRES INCERTAINS SUR L'ESTIMATION DU RISQUE DU SHU

L'actualisation du modèle a conduit d'une part, à l'estimation de la gamme d'incertitude entourant la valeur du paramètre b et d'autre part, à l'introduction de trois nouveaux paramètres en lien avec la contamination des carcasses ($m_{\text{souillures}}$, Se_{spot} , Se_{main}). A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude permettant d'estimer statistiquement les valeurs de ces trois paramètres, celles-ci ont donc été proposées à partir des données professionnelles et à dire d'experts. Afin de tester l'influence de ces paramètres d'entrée du modèle (b , $m_{\text{souillures}}$, Se_{spot} , Se_{main}) sur les sorties du modèle (risque de SHU, probabilité de détection des mêlées contaminées), des simulations ont été réalisées pour un scénario correspondant à la période de forte excrétion (Pf_{high} , Cf_{high}). Pour chaque paramètre incertain, plusieurs valeurs sont tirées au sort dans sa gamme d'incertitude. Pour chacune de ses valeurs, 100 000 itérations du modèle sont réalisées en fixant les autres paramètres incertains à leur valeur par défaut (Tableau 14). Pour chaque scénario, le risque moyen de SHU par portion de 100 g est estimé pour deux situations. Dans la première situation, situation de référence, les mêlées de viande hachée ne sont pas analysées. Le modèle considère donc que l'ensemble des steaks hachés fabriqués sont consommés. Le risque estimé dans cette situation est appelé risque de référence (R_0). Dans la seconde situation, les mêlées de viande hachée sont analysées de façon systématique (100% des mêlées analysées) selon le plan d'échantillonnage $n=1$, absence dans 25 g. Le modèle considère que les steaks hachés issus des mêlées détectées positives pour la présence de EHEC suite à l'analyse ne sont pas consommés (lots bloqués). Le risque estimé est le risque résiduel (R_r).

Tableau 14 : Valeurs des paramètres incertains tirées au sort et valeur par défaut

Paramètre incertain	Valeurs	Valeur par défaut
b	0,01 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 10	1
$M_{\text{souillures}}$	1 à 20 par pas de 1	10
Se_{spot}	10% à 90% par pas de 10%	50%
Se_{main}	10% à 90% par pas de 10%	80%

Pour chaque paramètre incertain, le risque de référence et le risque résiduel sont estimés et représentés en fonction de la valeur du paramètre incertain (Figures 16, 18, 20 et 22).

L'impact des paramètres incertains sur l'efficacité du plan d'échantillonnage en termes de probabilité de détection et sur la réduction du risque associée sont représentés dans les figures 17, 19, 21 et 23.

La valeur du paramètre b a peu d'influence sur le niveau de risque de référence lorsque b varie entre 0,01 (répartition de la contamination hétérogène) et 10 (répartition de la contamination homogène). En revanche, lorsque les mêlées sont analysées, l'hétérogénéité de la contamination a un impact important sur l'efficacité de l'échantillonnage et le niveau de risque associé. En effet, pour $b=0,01$, le risque moyen de SHU après analyses est estimé à $1,0 \times 10^{-5}$ soit 1 cas pour 100 000 steaks hachés de 100 g. Ce risque est abaissé à $1,0 \times 10^{-6}$ pour $b=0,5$, soit un cas par million de portions et à $5,3 \times 10^{-7}$, soit 1 cas pour 2 millions de portions, lorsque $b=1$ (contamination moyennement homogène). Pour des valeurs de b supérieures à 1, l'influence du paramètre sur le niveau de risque moyen est plus faible, celui-ci étant abaissé à $3,3 \times 10^{-7}$ lorsque $b=10$ (environ 1 cas pour 3 millions de portions) (Figure 16).

L'impact du paramètre b sur le risque de SHU après échantillonnage des mêlées est lié à l'efficacité du plan. En effet, plus la contamination est répartie de manière homogène au sein de la mêlée ($b>1$) plus la probabilité de détection avec le plan d'échantillonnage défini ($n=1$, absence dans 25g) augmente : 0,5% pour $b=0,1$ et environ 3% pour b supérieur à 1 (Figure 17). Les mêlées contaminées ont donc une probabilité plus élevée d'être détectées lorsque la répartition de la contamination est homogène ce qui entraîne une diminution du risque de SHU de plus de 95% lorsque $b>1$ (Figure 17).

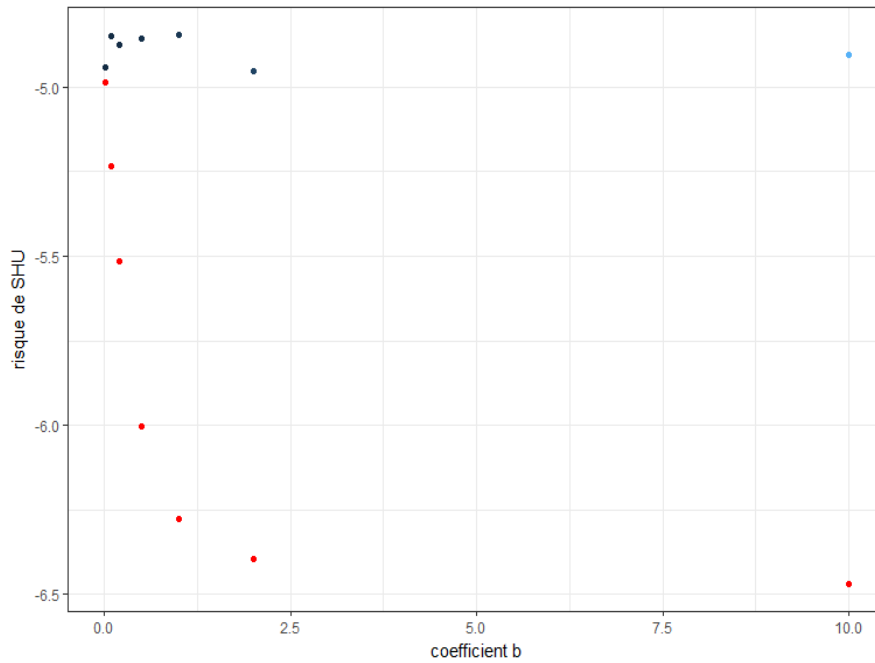


Figure 16 : Risque de référence (points bleus) et risque résiduel (points rouges) à l'échelle \log_{10} en fonction des valeurs du coefficient d'hétérogénéité de la contamination des mêlées b .

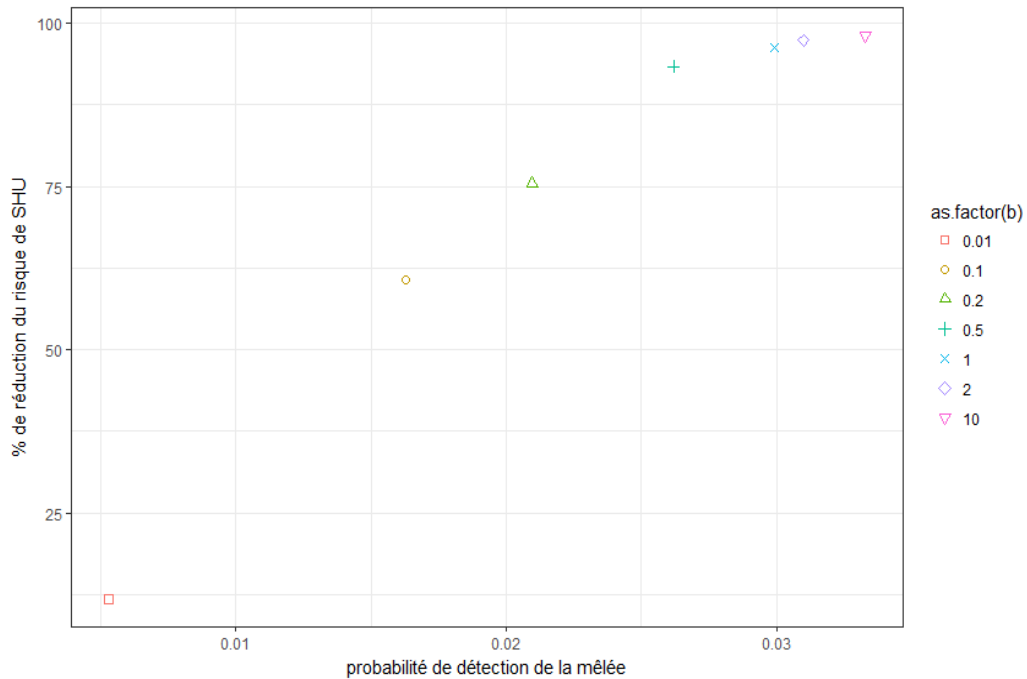


Figure 17 : Pourcentage de réduction du risque en fonction de la probabilité de détection des mêlées pour les différentes valeurs de b

Le nombre moyen de souillures par carcasse impacte de façon importante le risque de référence et le risque résiduel, les multipliant par un facteur 5 lorsque le nombre de souillures est augmenté de 1 à 20 (Figure 18). Pour un nombre moyen de 10 souillures par carcasse, le \log_{10} du risque de référence et celui du risque résiduel sont estimés à respectivement -4.96 (environ 1 cas pour 100 000 portions) et -6,28 (environ 1 cas pour 1,9 millions de portions). Le nombre de souillures influence également légèrement l'efficacité de l'échantillonnage : pour $m_{\text{souillures}}=1$, la probabilité de détection des mêlées est de 1% ; pour $m_{\text{souillures}}=20$, la

probabilité de détection est de 4%. Pour un nombre moyen de souillures par carcasse de 10, la probabilité de détection est de 3% (Figure 19). La réduction du risque associée (entre 95% et 98%) n'est cependant pas directement liée au nombre de souillures puisque des réductions différentes sont estimées pour des nombres de souillures et une probabilité de détection similaires (Figure 19).

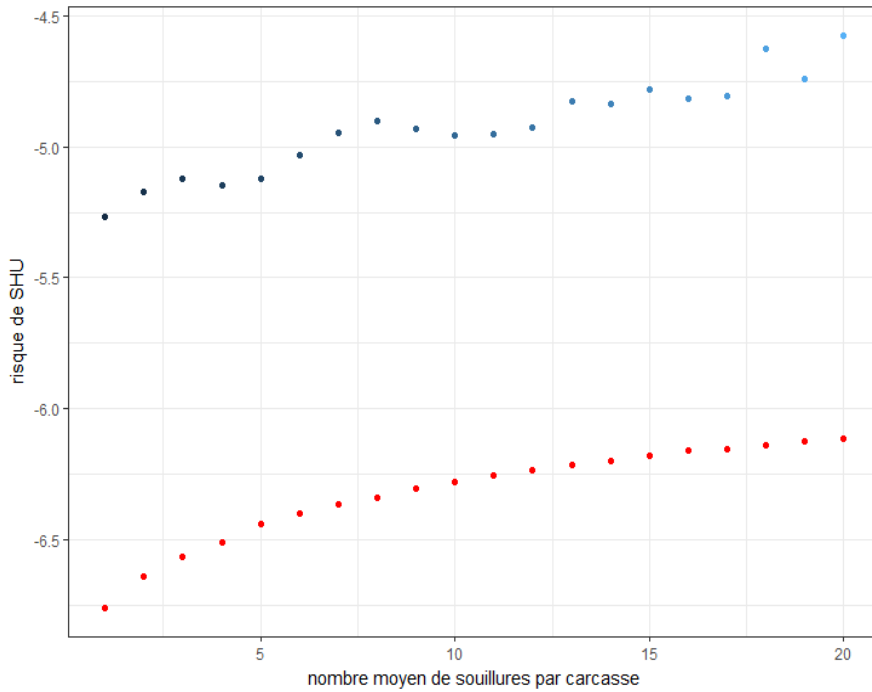


Figure 18 : Risque de référence (points bleus) et risque résiduel (points rouges) à l'échelle log₁₀ en fonction du nombre moyen de souillures par carcasse.

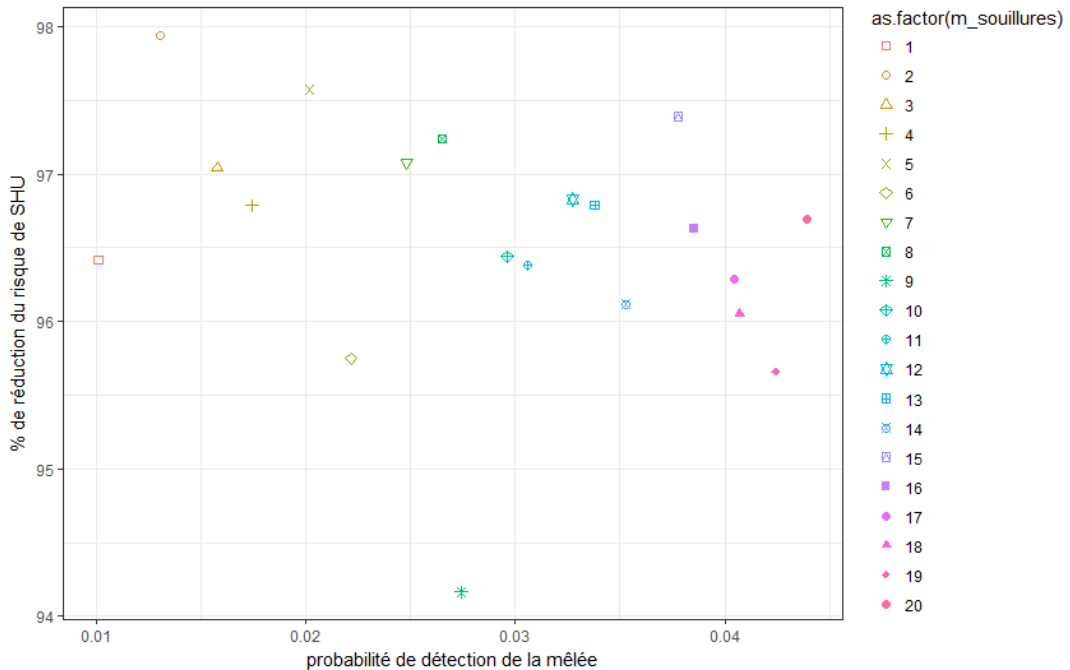


Figure 19 : Pourcentage de réduction du risque en fonction de la probabilité de détection des mélées pour les différentes valeurs de $m_{souillures}$

Le modèle est peu sensible à la probabilité de détection des souillures « spot ». En effet, quelle que soit cette probabilité, entre 10% et 90%, le \log_{10} du risque de référence est estimé à -5 et le risque résiduel, plus faible, varie entre -6,2 et -6,4 (Figure 20). Lorsque la probabilité de détection des spots augmente, l'efficacité de l'échantillonnage diminue légèrement entraînant une plus faible réduction du risque lié à celui-ci (Figure 21). Pour une probabilité de détection des souillures « spot » de 50%, le \log_{10} du risque de référence est estimé à -4,88 soit environ 1 cas pour 80 000 portions et celui du risque résiduel à -6,28 (environ 1 cas pour $1,8 \times 10^6$ portions) soit une réduction du risque associée à l'échantillonnage de 96%.

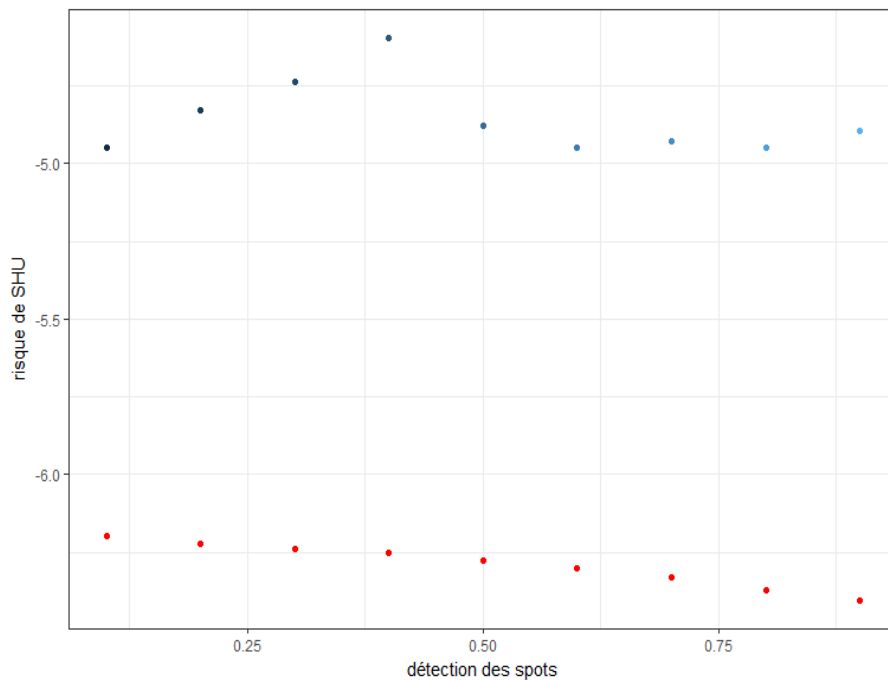


Figure 20 : Risque de référence (points bleus) et risque résiduel (points rouges) à l'échelle \log_{10} en fonction de la probabilité de détection des souillures de type « spot » sur les carcasses.

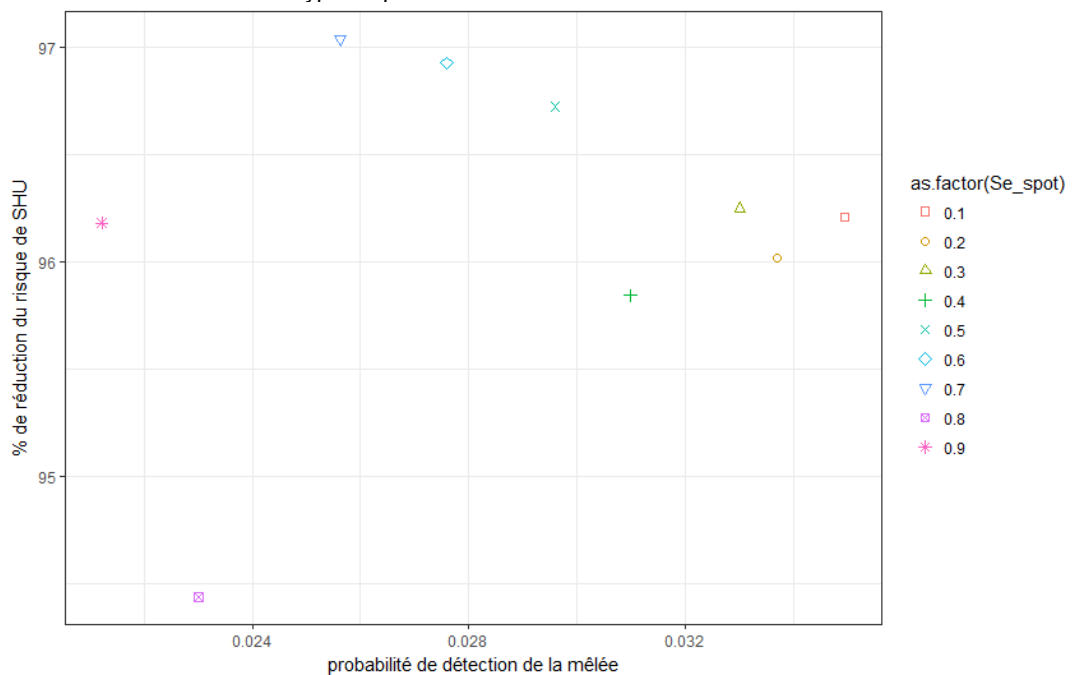


Figure 21 : Pourcentage de réduction du risque en fonction de la probabilité de détection des mêlées pour les différentes valeurs de probabilité de détection des souillures de type « spot » sur les carcasses (Se_{spot})

En revanche, la probabilité de détection des souillures de type « main », plus importantes en taille mais moins fréquentes que les spots, influence les sorties du modèle. En effet, les \log_{10} des risques de référence et résiduel sont réduits d'environ 0,5 lorsque la probabilité de détection augmente de 10% à 90% soit une réduction d'un facteur 3 (Figure 22). De la même manière que pour les spots, plus la probabilité de détecter les souillures de type « main » sur les carcasses est grande, moins le plan d'échantillonnage testé est efficace ce qui entraîne une diminution de la réduction du risque, qui reste comprise entre 95% et 97% (Figure 23). Pour une probabilité de détection des souillures « main » de 80%, le \log_{10} du risque de référence R_0 est estimé à -5 soit 1 cas pour 100 000 portions et celui du risque résiduel R_r est estimé à -6.3 (environ 1 cas pour 2 millions de portions) soit une réduction du risque de 95%.

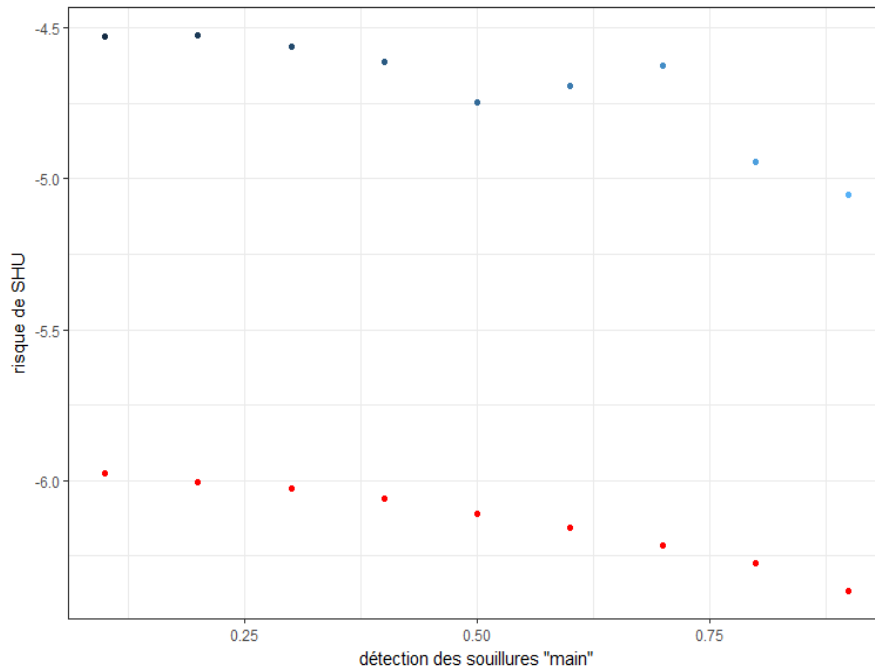


Figure 22 : Risque de référence (points bleus) et risque résiduel (points rouges) à l'échelle \log_{10} en fonction de la probabilité de détection des souillures de type « main » sur les carcasses.

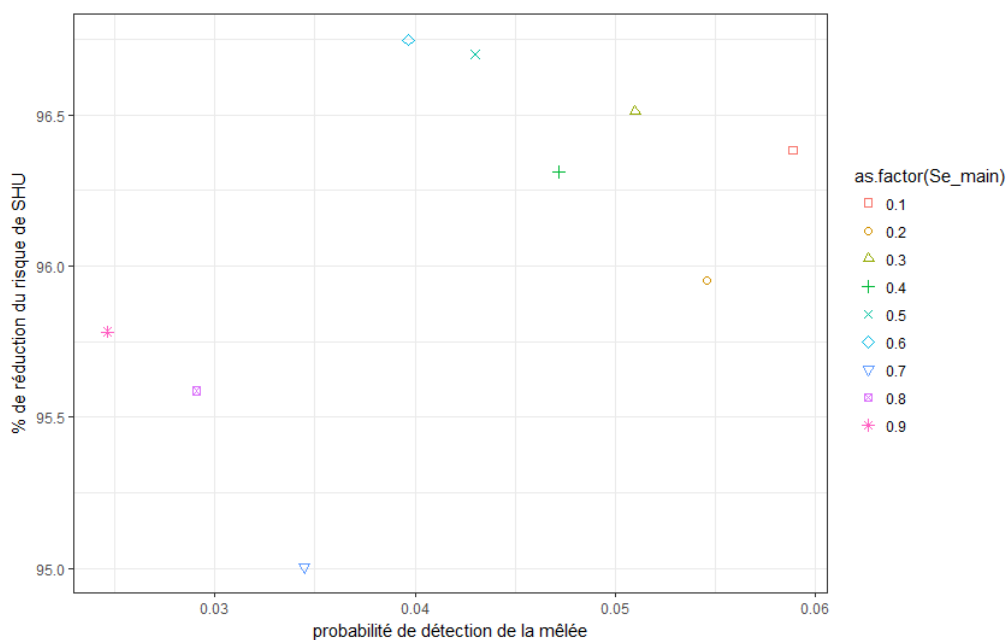


Figure 23 : Pourcentage de réduction du risque en fonction de la probabilité de détection des mélées pour les différentes valeurs de probabilité de détection des souillures de type « main » sur les carcasses (Se_{main}).