



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

**Appréciation quantitative des risques liés à *Escherichia coli* O157:H7
dans les steaks hachés surgelés consommés en restauration familiale
en France par les enfants de moins de 16 ans**

-octobre 2007-

Coordonnateurs de rédaction :

-Mme Christine Vernozy-Rozand

-Mme Rozenn Saunier

Composition du groupe de travail « AQR STEC » de l'Afssa

- **Président :**

Mme Christine Vernozy-Rozand

Unité de microbiologie alimentaire et prévisionnelle - École nationale vétérinaire de Lyon
CES Microbiologie

- **Coordination scientifique – Afssa :**

Mme Rozenn SAUNIER (Unité d'évaluation des risques biologiques)

- **Membres :**

Mme Nawel Bemrah (Pôle d'appui scientifique à l'évaluation des risques – Afssa)

M. Hubert Brugère (École nationale vétérinaire de Toulouse – Toulouse)

M. Olivier Cerf (École nationale vétérinaire d'Alfort - Maisons-Alfort)
CES Microbiologie

Mme Marie Cornu (Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires Afssa – Maisons-Alfort)

Mme Marie-Laure Delignette-Muller (Unité de microbiologie alimentaire et prévisionnelle - École nationale vétérinaire de Lyon)

Mme Emmanuelle Espié (Département des maladies infectieuses - Institut de veille sanitaire- Saint-Maurice)

M. Vincent Heuchel (Institut de l'Élevage)

M. Vincent Leclerc (Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires Afssa)

Mme Valérie Livrelli (Faculté de pharmacie, Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand)

M. Jean-Yves Madec (Laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes - Afssa Lyon)

Mme Patricia Mariani-Kurkdjian (Service de microbiologie - Hôpital Robert Debré- Paris)

Mme Sabrina Raynaud (Institut de l'Élevage- Lyon)

- **Experts consultés par le groupe de travail**

Participation scientifique – Afssa

Mme Hélène Bergis (Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires - Afssa)

Mme Françoise Gauchard (Pôle d'appui scientifique à l'évaluation des risques – Afssa)

Mme Aurélie Mahé (Pôle d'appui scientifique à l'évaluation des risques – Afssa)

Mme Rozenn Saunier (Unité d'évaluation des risques biologiques)

Autres

Association clinique et thérapeutique infantile du Val de Marne (ACTIV)

CEMAGREF (Institut de recherche pour l'ingénierie de l'agriculture et de l'environnement)

Mme Françoise Kremer (Direction générale de l'alimentation)

M. Lionel Lafay (Pôle d'appui scientifique à l'évaluation des risques – Afssa)

Mme Chantal Loirat (Service de néphrologie pédiatrique- Hôpital Robert Debré – Paris)

M. Pierre Pothier (Le laboratoire de microbiologie médicale et moléculaire - CHU Dijon)

Mme Anne Thébault (Pôle d'appui scientifique à l'évaluation des risques – Afssa)

Liste non exhaustive des écoles, collèges et lycées (enquête sur les habitudes de cuisson) :

- Collège Tassin la Demi Lune (Lyon)
- Ecole primaire de la Croix Duny (Argenteuil)
- Ecole Notre-Dame (Mantes-la-Jolie) et Mme Patricia CARPENTIER, sa Directrice
- Ecole Maternelle Groupe scolaire Jean Moulin (Veyre Monton)

• **Relecteurs (CES Microbiologie):**

M. Pierre Colin (ESMISAB - Afssa)

M. Jean-Baptiste Denis (Unité MIA - INRA Jouy en Josas)

M. Philippe Cartier (Institut de l'Elevage- Villiers Bocage)

Répartition des contributions

Module	Responsable	Rédacteur	Personnalités consultées
Introduction générale	C. Vernozzy-Rozand	C. Vernozzy-Rozand et R. Saunier	
Amont de la filière	S. Raynaud	S. Raynaud, V. Heuchel et C. Vernozzy-Rozand	
Prévalence et niveau de contamination	C. Vernozzy-Rozand	C. Vernozzy-Rozand et M-L Delignette-Muller	
Consommation	R. Saunier	R. Saunier et A. Mahé	A. Mahé et N. Bemrah-Aouachria
Habitudes de cuisson des steaks hachés	R. Saunier et N. Bemrah- Aouachria	N. Bemrah- Aouachria	P. Mariani-Kurkdjian et A. Mahé
Destruction thermique	M. Cornu	M. Cornu, M-L Delignette-Muller et H. Bergis	H. Bergis
Loi dose/réponse	V. Livrelli	M. Cornu, E. Espié, V. Livrelli, V. Leclerc, M-L Delignette-Muller, et P. Mariani-Kurkdjian	C. Loirat
Appréciation quantitative des risques	M-L Delignette-Muller	M-L Delignette-Mulle et M. Cornu	J-B Denis
Synthèse	O. Cerf	O. Cerf	

Sommaire

Introduction générale **14**

- 1- Contexte et justification du projet
- 2- Constitution du groupe de travail
- 3- Rappels généraux sur l'Appréciation Quantitative des Risques (AQR)
 - 3.1. Rappels Généraux
 - 3.2. Notion de variabilité et d'incertitude
 - 3.3 Différentes approches de l'AQR
 - 3.4. Validation du modèle
- 4- Méthodologie du groupe de travail
 - 4.1. Revue critique de la littérature
 - 4.2. Données nouvelles et renforcement de l'approche STEC AQR
 - 4.3. Déroulement de l'AQR

Module n° 1 : Amont de la filière : élevage, transport, abattoir, découpe **21**

- 1- Elevage
- 2- Rôle du transport
- 3- Stade abattoir / découpe
- 4- Conclusions

Chapitre I: Appréciation de l'exposition **26**

Module n° 2 : Prévalence et niveau de contamination **27**

- 1- Production de viande hachée de bœuf en France
- 2- Contamination des steaks hachés industriels de bœuf par *E. coli* O157:H7 : Revue de la littérature
 - 2.1. Prévalence
 - 2.2. Quantification des *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée industrielle de bœuf
 - 2.2.1. Méthode NPP (nombre le plus probable)
 - 2.2.2. Méthode par dilutions décimales et dénombrement de colonies caractéristiques sur milieux spécifiques
- 3- Estimation du niveau de contamination des steaks hachés industriels en France
 - 3.1 Estimation du niveau de contamination hors épidémies
 - 3.2 Estimation du niveau de contamination lors de l'épidémie survenue en 2005
- 4- Conclusions

Module n° 3 : Consommation **33**

- 1- Données de consommation utilisées
 - 1.1. Enquête bébés
 - 1.2. Enquête INCA
 - 1.3. Effectif INSEE
 - 1.4. Panel SECODIP
- 2- Estimation de la consommation de steaks hachés dans la population française
 - 2.1. Portions ingérées

- 2.2. Consommation de steaks hachés
- 3- Conclusions

Module n° 4 : Enquête sur les habitudes de cuisson des steaks hachés consommés par les enfants de moins de 16 ans **36**

- 1- Contexte et objectif
- 2- Méthodologie
- 3- Résultats
 - 3.1. Caractéristiques socio-démographiques
 - 3.2. Niveau de cuisson des steaks hachés
- 4- Discussions
- 5- Conclusions

Module n°5 : Destruction thermique **42**

- 1- Etat de l'art
- 2- Expérimentations et modélisation retenue
 - 2.1. Introduction
 - 2.2 Matériel et méthodes
 - 2.3. Résultats
 - 2.4. Modélisation retenue
- 3- Discussion
- 4- Conclusions

Chapitre II: Appréciation des effets **48**

Module n°6 : Loi dose/réponse **49**

- 1- Introduction
 - 1.1. Appréciation des effets
 - 1.2. Relation Dose Réponse
- 2- Données provenant d'infections expérimentales
 - 1.1. *Shigella* / volontaires sains
 - 1.2. *E. coli* entérotoxigènes (EPEC) / volontaires sains
 - 1.3. *E. coli* O157:H7 / lapins
- 3 - Données provenant d'épidémies
 - 3.1. Epidémie dans une école de Morioka, Japon
 - 3.2. Epidémie due à la consommation de "Deer jerky", Oregon, USA
 - 3.3. Epidémie liée à la consommation de hamburgers en 1992 – 1993, USA
 - 3.4. Epidémie liée à la consommation de salami, USA
 - 3.5. Epidémie liée à de l'eau de baignade, Illinois, USA
 - 3.6. Epidémie au cours d'un camp scout, Ecosse
 - 3.7. Autres épidémies
- 4- Modèles utilisés
 - 4.1. Généralités
 - 4.2. Modèles construits à partir des données extraites d'épidémies publiées
 - 4.3. Modèles construits à partir de données *Shigella* sur des volontaires sains
 - 4.4. Modèles construits à partir d'autres approches
 - 4.5. Comparaison des modèles et des données
- 5- Relation maladie-SHU-décès

- 5.1. Probabilité de développer un SHU sachant que le patient présente une maladie à *E. coli* O157
- 5.2. Probabilité de décéder sachant que le patient présente un SHU
- 5.3. Choix des valeurs susceptibles d'être introduites dans l'AQR
- 5.4. Données provenant de l'épidémie française de 2005
- 6- Discussion
 - 6.1. Limites liées aux données expérimentales
 - 6.2. Limites liées aux données d'épidémies
- 7- Conclusions

Chapitre III: Estimation du risque

73

Module n°7 : Appréciation quantitative des risques

74

- 1- Introduction
- 2- Etape 1 : construction d'un modèle d'AQR et confrontation aux données de l'épidémie française de 2005
 - 2.1. Description générale des différents modules et des hypothèses du modèle
 - 2.1.1. Appréciation de l'exposition
 - 2.1.2. Appréciation des effets
 - 2.1.3. Estimation des risques
 - 2.2. Données disponibles
 - 2.2.1. Niveau de contamination
 - 2.2.2. Destruction thermique
 - 2.2.3. Consommation
 - 2.2.4. Nombre de cas de SHU lors de l'épidémie de 2005
 - 2.3. Méthode de simulation
 - 2.3.1. Simulations de l'appréciation de l'exposition
 - 2.3.2. Simulations de l'estimation des risques
 - 2.4. Résultats des simulations obtenues à partir du modèle pour l'épidémie française de 2005
 - 2.4.1. Appréciation de l'exposition
 - 2.4.2. Estimation des risques
- 3- Etape 2 : établissement de lois dose-réponse chez enfants de moins de 10 ans à partir des données de l'épidémie de 2005
 - 3.1. Description de la démarche et des modèles
 - 3.1.1. Démarche
 - 3.1.2. Trois modèles utilisés
 - 3.1.3. Méthode d'inférence bayésienne
 - 3.2. Résultats de l'inférence bayésienne
 - 3.3. Quelques éléments de discussion
- 4- Etape 3 : Simulation de divers scénarios à partir des modèles dose-réponse retenus pour chaque classe d'âge
 - 4.1. Modèles retenus
 - 4.1.1. Appréciation de l'exposition
 - 4.1.2. Appréciation des effets
 - 4.1.3. Estimation des risques
 - 4.2. Méthode de simulation
 - 4.2.1. Simulation du nombre de SHU lors de l'épidémie de 2005
 - 4.2.2. Simulation du risque individuel de SHU en fonction de la concentration en pathogène dans la viande avant cuisson

4.2.3. Simulation du risque individuel de SHU pour divers scénarios de cuisson

5- Conclusions et discussion

Synthèse

100

- 1- Introduction
- 2- Appréciation de l'exposition
 - 2.1. Consommation de steak haché
 - 2.2. Contamination des steaks hachés industriels par des STEC
 - 2.3. Modes de cuisson
 - 2.4. Effet assainissant de la cuisson
- 3- Appréciation des effets : relation dose-réponse
- 4- Estimation du risque
- 5- Établissement de nouvelles relations dose réponse
- 6- Utilisation de ces relations
- 7- Limites de l'étude et perspectives

Annexes

105

Références bibliographiques

Figures

- Figure 1 : Schéma de fabrication de la viande hachée industrielle
- Figure 2 : Distribution observée du nombre de colonies
- Figure 3 : Moyennes et plages approximatives des nombres de réductions décimales d'*Escherichia coli* O157:H7 reportés dans la littérature pour différentes températures à cœur dans des steaks hachés cuits sur simple grille avec un seul retournement en cours de cuisson
- Figure 4 : Destruction de *E. coli* O157:H7 en fonction du niveau de cuisson (appréciation visuelle majoritaire)
- Figure 5 : Schéma des différents modules pour l'appréciation des effets
- Figure 6 : Schéma de différents modules pour l'appréciation des conséquences d'un même agent infectieux
- Figure 7 : Schéma simplifié des différents modules pour l'appréciation des effets de l'ingestion d'*E. coli* O157:H7 chez l'enfant de moins de 15 ans
- Figure 8 : Représentation graphique d'une sélection de données potentiellement pertinentes pour l'évaluation de la loi dose-réponse (Pmal en fonction de Dmoy) pour *E. coli* O157:H7
- Figure 9 : Représentation graphique des modèles dose-maladie (Pmal en fonction de Dmoy) et des données d'épidémies
- Figure 10 : Schéma de la démarche suivie
- Figure 11 : Schéma décrivant les paramètres du module d'appréciation de l'exposition
- Figure 12 : Distribution du risque de maladie (en logarithme décimal) associé à l'ingestion d'une bactérie pour chacun des trois modèles dose-réponse retenus
- Figure 13 : Distribution en fréquences pour chaque classe d'âge des doses ingérées simulées, en logarithme base 2 avec le log2 des doses nulles fixé arbitrairement à -1 pour rendre possible la représentation graphique
- Figure 14 : Graphe du modèle décrivant le nombre de SHU dans une classe d'âge à partir d'un modèle dose-réponse exponentiel
- Figure 15 : Graphe du modèle décrivant le nombre de SHU dans une classe d'âge à partir d'un modèle dose-réponse exponentielle-Poisson
- Figure 16 : Graphe du modèle décrivant le nombre de SHU dans une classe d'âge à partir d'un modèle dose-réponse bêta-Poisson
- Figure 17 : Distribution du risque de SHU (en logarithme décimal) associé à l'ingestion d'une bactérie pour chacun des modèles dose-réponse retenus sur les trois classes d'âge (les deux traits verticaux correspondent aux valeurs constantes de r dans le modèle exponentiel)
- Figure 18 : Risque individuel moyen de SHU lié à une prise alimentaire de steak haché surgelé cuit selon les modalités observées en restauration familiale en fonction de la concentration en pathogène dans la viande hachée crue, pour les trois classes d'âge et les divers modèles dose-réponse retenus
- Figure 19 : Courbes de risque individuel moyen de SHU intégrant une partie de l'incertitude
- Figure 20 : Risque individuel moyen de SHU lié à une prise alimentaire de steak haché surgelé en fonction de la concentration en pathogène dans la viande hachée crue, pour les moins de 5 ans et le modèle dose-réponse exponentiel, en fonction du mode de cuisson

Tableaux

- Tableau 1 : Distribution des portions ingérées pour chaque classe d'âge
- Tableau 2 : Estimation de la consommation de steaks hachés dans la population française par classe d'âge
- Tableau 3 : Caractéristiques socio-démographiques renseignées dans les questionnaires
- Tableau 4 : Niveaux de cuisson des steaks hachés consommés à la maison

- Tableau 5 : Niveaux de cuisson des steaks hachés consommés à la maison par classe d'âge
- Tableau 6 : Résultats de l'appréciation visuelle et de la destruction microbienne pour chaque cuisson
- Tableau 7 : Bilan par type de cuisson
- Tableau 8 : Bilan des données expérimentales (volontaires sains et animaux) utilisées pour construire des lois dose-réponse
- Tableau 9 : Bilan des données d'épidémies à *E. coli* O157:H7 et des calculs publiés pour construire/valider une loi dose-réponse
- Tableau 10 : Modèles dose-réponse publiés, avec r : probabilité de l'effet étudié si ingestion d'une cellule
- Tableau 11 : Données disponibles sur les infections à *E. coli* O157:H7 pour étudier les relations maladie-SHU-décès, à partir de la littérature internationale
- Tableau 12 : Description des modèles dose-réponse retenus
- Tableau 13 : Distribution des modes de cuisson pour chaque classe d'âge
- Tableau 14 : Distribution du nombre de réductions décimales pour chaque mode de cuisson
- Tableau 15 : Distribution des portions ingérées pour chaque classe d'âge
- Tableau 16 : Distribution en fréquences pour chaque classe d'âge des doses ingérées simulées, en logarithme base 2 avec le \log_2 des doses nulles fixé arbitrairement à -1 pour rendre possible la représentation graphique
- Tableau 17 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de malades dans la classe d'âge [0 – 5 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 146 prises alimentaires dans cette classe d'âge
- Tableau 18 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de malades dans la classe d'âge [5 – 10 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 150 prises alimentaires dans cette classe d'âge
- Tableau 19 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de malades dans la classe d'âge [10 – 16 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 292 prises alimentaires dans cette classe d'âge
- Tableau 20 : Estimations des paramètres des modèles dose-réponse pour chaque classe d'âge, accompagnées de l'intervalle de crédibilité à 95%
- Tableau 21 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de SHU dans la classe d'âge [0 – 5 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 146 prises alimentaires dans cette classe d'âge
- Tableau 22 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de SHU dans la classe d'âge [5 – 10 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 150 prises alimentaires dans cette classe d'âge
- Tableau 23 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de SHU dans la classe d'âge [10 – 16 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 292 prises alimentaires dans cette classe d'âge
- Tableau 24 : Estimations du risque individuel moyen de SHU et du nombre de cas sporadiques de SHU dans la classe d'âge [0 – 5 ans[avec les 3 modèles dose-réponse pour une concentration en *Escherichia coli* O157:H7 dans la viande hachée de 5.10^{-5} ufc.g⁻¹
- Tableau 25 : Estimations du risque individuel moyen de SHU et du nombre de cas sporadiques de SHU dans la classe d'âge [5 – 10 ans[avec les 3 modèles dose-réponse pour une concentration en *Escherichia coli* O157:H7 dans la viande hachée de 5.10^{-5} ufc.g⁻¹
- Tableau 26 : Estimations du risque individuel moyen de SHU et du nombre de cas sporadiques de SHU dans la classe d'âge [10 – 16 ans[avec les 3 modèles dose-réponse pour une concentration en *Escherichia coli* O157:H7 dans la viande hachée de 5.10^{-5} ufc.g⁻¹
- Tableau 27 : Efficacité de la cuisson à la poêle avec un seul retournement

Annexes

Annexe 1 : Protocole enquête sur les habitudes de cuisson

Annexe 2 : Guide des niveaux de cuisson

Annexe 3 : Notes d'appui scientifique et technique rédigées par le groupe

-Note en date du 7 novembre 2006 relative à l'évaluation de la contamination par *E. coli* O157:H7 dans la filière de production des viandes hachées.

-Note en date du 18 avril 2006 relative à la surveillance de la contamination par *E. coli* STEC dans la filière de production des viandes hachées.

Liste des sigles et abréviations

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

ALOP : Appropriate level of protection, niveau de protection acceptable

AQR : Appréciation quantitative des risques (ou du risque)

CES : Comité d'experts spécialisé

CHU : Centre hospitalo-universitaire

E. coli : *Escherichia coli*

Eae: facteur d'attachement et d'effacement aux cellules intestinales

ENVL : école nationale vétérinaire de Lyon

EPEC : *Escherichia coli* entéro pathogène

FSO : Food safety objective, objectif de sécurité alimentaire

HACCP : Hazard analysis critical control points

INCA : enquête individuelle et nationale des consommations alimentaires

INSEE : institut national de la statistique et des études économiques

InVS : Institut de Veille Sanitaire

Lerqap : Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires
D : temps de réduction décimale

NPP : nombre le plus probable

RD : (nombre de) réductions décimales

SHU : Syndrome hémolytique urémique

Sofres et Secodip : instituts d'études marketing et d'opinion internationales

STEC : *Escherichia coli* producteur de Shiga-toxines

Stx : Shiga-toxine

ufc : unité formant colonie

Résumé

Des études épidémiologiques conduites en France montrent que la consommation de steaks hachés de bœuf est le premier facteur de risque d'une maladie grave causée par les bactéries *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines ou STEC, le syndrome hémolytique urémique (SHU). Aussi, pour compléter le bilan sur les *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines publié par l'Afssa en 2003, le groupe de travail a reçu la mission de mener à bien une appréciation quantitative des risques associés à l'ingestion de steaks hachés de bœuf contenant des STEC.

La démarche suivie est celle recommandée par le Codex alimentarius : l'identification du danger ayant déjà été réalisée en 2003, le groupe a donc travaillé à l'appréciation de l'exposition (dont le but est de connaître la quantité, ou dose, de STEC à laquelle le consommateur est exposé), l'appréciation des effets (dont le but est de connaître la réponse, c'est-à-dire la probabilité d'un effet morbide, en fonction de la dose) et l'estimation du risque (estimation du nombre de cas de l'effet morbide étudié dans la population).

Pour mener à bien ses travaux, le groupe de travail a utilisé des données bibliographiques et a dû acquérir des données (notamment relative à la consommation) qui faisaient défaut. Il a donc réalisé une enquête de consommation de viandes hachées chez les jeunes enfants et mesuré expérimentalement l'effet assainissant de la cuisson. Le groupe a alors pu construire de nouvelles relations dose-réponse (permettant d'établir un lien entre la dose ingérée de microorganismes et l'effet sanitaire) notamment pour les jeunes enfants. Les relations publiées antérieurement au niveau international ne correspondaient pas à la situation de l'épidémie à *E. coli* O157:H7 survenue en France en 2005.

Le groupe de travail s'est concentré sur les données disponibles pour la France, ce qui a permis d'estimer un ordre de grandeur du niveau de contamination des viandes hachées crues à 5.10^{-5} STEC par gramme en situation non épidémique et de l'ordre de 100 000 fois plus (soit 5 STEC par gramme) lors de l'épidémie de 2005.

Après exploitation des données de consommation, il apparaît que près de 50% des enfants de moins de 5 ans mangent les steaks bien cuits (et de respectivement 29% et 24% pour les classes d'âge 5-10 et 10-15 ans). La proportion de consommation de steaks saignants croît avec l'âge des enfants : 10%, 17% puis 20% pour chacune des classes d'âge définies (moins de 5 ans, 5-10 ans et 10-15ans). Pour ce qui concerne l'efficacité de la cuisson (cuisson à la poêle avec un seul retournement du steak non décongelé), il est à noter que le type de cuisson « saignant » est associé à un pourcentage de destruction des STEC de 0% à 87 % ; le type « rosé » de 37% à 96% et le type « bien cuit » de 94% à 99,8%. Eu égard aux habitudes de consommation prévalant aujourd'hui en France dans les ménages, ces résultats mettent en évidence l'importance des effets de la cuisson sur la destruction des STEC (actuellement insuffisante), et de l'hygiène de la production des steaks hachés.

Afin d'aider les services ministériels à prendre des décisions pour la gestion du risque de SHU, le groupe de travail a élaboré un graphique et une formule de calcul approché de la probabilité moyenne de développer un SHU en fonction de la concentration en pathogène dans la viande surgelée, du fait de la consommation en restauration familiale d'une portion de steak de viande hachée de bœuf achetée surgelée et provenant de la filière industrielle française.

Les trois points marquants de ce rapport sont que ce travail :

- présente la première appréciation quantitative du risque réalisée en France sur ce pathogène ;
- établit le premier modèle mathématique appliqué aux données françaises ;
- dresse un bilan exhaustif des données disponibles mais également de celles qui restent à acquérir.

La synthèse de l'étude se trouve en fin de document.

Introduction générale

1- Contexte et justification du projet

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés, par la communauté scientifique, comme des pathogènes émergents importants en santé publique. Ils sont à l'origine depuis deux décennies d'épidémies de colites hémorragiques sévères, nécessitant une hospitalisation pour plus de la moitié des malades (Tarr, 1995). Le sérotype O157:H7 a été celui le plus souvent mis en évidence lors de ces épidémies (Griffin *et al.* 2001).

C'est dans ce contexte général, qu'en 2001, le comité d'experts « Microbiologie » de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a rédigé la fiche de danger « *Escherichia coli* O157:H7 » et que, sur la base d'une saisine des ministères de tutelle, une réflexion sur les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines a été menée dans le cadre d'un groupe de travail.

Ce groupe de travail dénommé « *Escherichia coli* vérotoxiques » a été constitué en octobre 2001. Un rapport constituant un bilan actualisé des connaissances sur ces pathogènes a été rédigé et rendu public en avril 2003 (« Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) » Afssa, 2003).

Les conclusions de ce rapport pointaient notamment trois axes de recherche considérés comme prioritaires par les experts. Il s'agit de :

1. disposer d'une méthode de détection des STEC dans les aliments et dans l'environnement, harmonisée à l'échelon national.
2. démarrer une approche d'appréciation quantitative du risque (AQR) lié aux STEC dans certaines familles d'aliments. Cette approche pourrait commencer par l'analyse des travaux existant à l'échelon international, ce qui permettrait d'établir un bilan précis des données manquantes.
3. améliorer la communication et la collaboration entre équipes pluridisciplinaires (épidémiologistes, médecins, microbiologistes, statisticiens, gestionnaires des risques) pour recueillir une information épidémiologique mieux adaptée à l'établissement de la relation dose-réponse.

2- Constitution du groupe de travail

Suite à la rédaction de ce premier rapport, l'Afssa s'est auto-saisie sur la question de l'appréciation quantitative du risque (AQR) liés aux STEC dans certaines catégories d'aliments. Elle a donc modifié le groupe de travail existant et a créé le 2 février 2004 un second groupe de travail chargé, d'une part, de réaliser une étude critique des appréciations quantitatives des risques réalisées sur les STEC dans d'autres pays, et d'autre part, de faire l'étude de la faisabilité d'une telle démarche en France. Ce groupe de travail, présidé par Madame le Professeur Christine Vernozzy-Rozand, comprenait des experts du comité d'experts spécialisé (CES) « Microbiologie », et des experts extérieurs à l'Agence dont la liste figure en pages 3 et 4.

La viande hachée de bœuf insuffisamment cuite et contaminée par *E. coli* O157:H7 étant l'aliment le plus souvent en cause dans la survenue de cas sporadiques et d'épidémies d'origine alimentaire, c'est tout naturellement vers ce couple matrice /pathogène (viande hachée / *E. coli* O157:H7) que le groupe de travail a dirigé ses investigations. La définition des classes d'âge ([0 ; 5 ans[; [5 ; 10 ans[et [10 ; 16 ans]) telle qu'opérée dans l'AQR est justifiée par les données bibliographiques et la sensibilité plus forte à la maladie des très jeunes enfants.

Par ailleurs, les réponses à des demandes d'appui scientifique et technique concernant *E. coli* reçues de la Direction Générale de l'Alimentation et dont le traitement a été confié au groupe sont placées en annexe de ce rapport. Ces demandes visaient notamment à définir une souche STEC pathogène et à proposer des mesures de gestion des mêlées de viande hachée contaminées par *E. coli* O157:H7.

3- Rappels généraux sur l'Appréciation Quantitative des Risques (AQR)

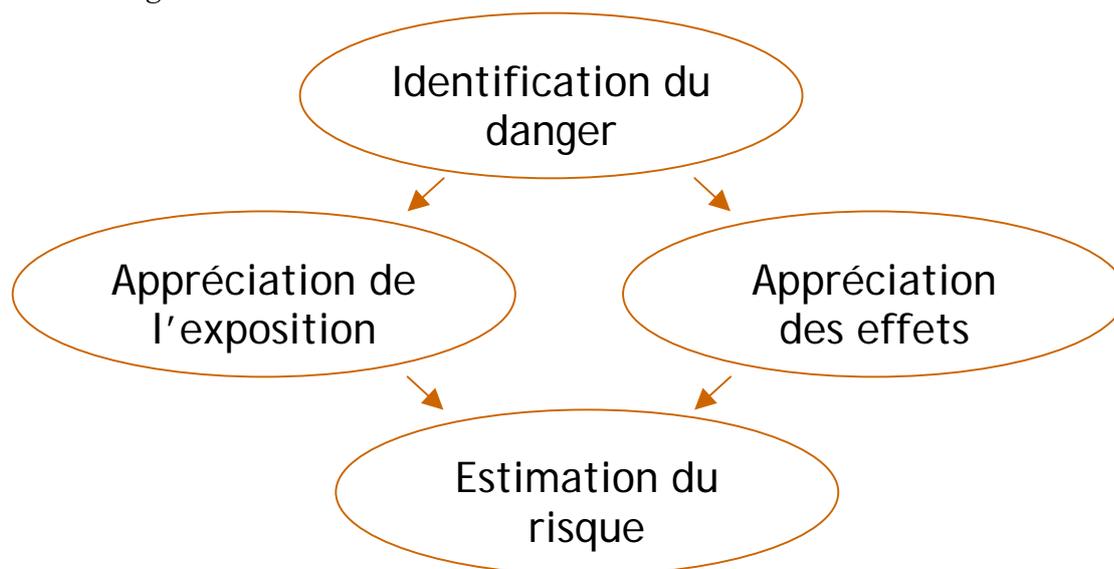
3.1. Données Générales

Cette partie a été adaptée du document du groupe de travail « Virus transmissibles à l'homme par voie orale » ; Extrait de la question 8 (Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'Appréciation Quantitative des risques alimentaires liés aux virus ?) :

Le risque est défini comme « une fonction de la probabilité de survenue d'un effet néfaste sur la santé et de la gravité de cet effet résultant de la présence d'un ou de plusieurs dangers dans un aliment » (Desenclos, 1996; FAO/OMS, 1995).

L'appréciation (ou évaluation scientifique) quantitative des risques (AQR) comprend 4 étapes (adapté au contexte microbiologique/alimentaire) :

- L'identification des dangers (hazard identification) : *identification des agents biologiques pouvant causer des effets néfastes sur la santé et associés à une denrée alimentaire ou groupe de denrées alimentaires à partir de données épidémiologiques, expérimentales ou de surveillances des aliments.*
- L'appréciation de l'exposition (exposure assessment) : *appréciation quantitative de la probabilité d'ingestion d'une certaine quantité d'agents biologiques néfastes via l'alimentation. L'appréciation des conséquences passe par la relation dose-réponse lorsqu'elle est disponible.*
- L'appréciation des effets (hazard characterisation) : *appréciation quantitative des effets néfastes sur la santé associés à l'ingestion d'un certain nombre d'agents biologiques ingérés*



- L'estimation des risques (risk characterization) : *estimation du risque sanitaire associé à la consommation d'un aliment ou groupe d'aliment, vis à vis d'un agent*

microbiologique, et de l'incertitude y afférente, s'appuyant sur l'appréciation de l'exposition et l'appréciation des conséquences.

L'identification des dangers n'est pas abordée dans ce document, dans la mesure où ce point a été développé dans le rapport « Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) » (Afssa, 2003).

3.2. Notion de variabilité et d'incertitude

De façon générale, **la notion de variabilité** d'un paramètre s'applique à la variation naturelle d'un phénomène biologique observé, par exemple la diversité de réponse dans une population donnée, ou une variabilité de consommation d'un aliment d'un jour à l'autre ou d'un individu à l'autre. Cette variabilité est connue, et ne pourrait pas être réduite par une autre expérience dans les mêmes conditions ni par un apport d'information, cette variabilité étant le fruit du hasard (Haas, *et al.*, 1999b; Rai, *et al.* ; 1996; Vose, 2000).

La notion d'incertitude est liée à une insuffisance d'information, par exemple quand un paramètre nécessaire à la modélisation n'a pu être estimé qu'indirectement, ou à partir d'un faible nombre de valeurs, comme par exemple les performances d'une technique d'analyse. L'incertitude peut être réduite par tout nouvel apport d'information.

3.3. Différentes approches de l'AQR

L'appréciation quantitative du risque permet d'aboutir, par une approche faisant appel aux probabilités, à une estimation quantifiée du risque, permettant une aide à la décision ou à la gestion de ce risque. On distingue classiquement, suivant l'approche et le résultat final, deux types d'appréciations quantitatives de risque (Haas *et al.* 1999).

Le premier type se caractérise par une approche **déterministe**, le résultat obtenu est **ponctuel**, c'est à dire qu'à partir d'une valeur moyenne ou extrême, on aboutit à une valeur ou à une estimation ponctuelle du risque souvent biaisée c'est-à-dire éloignée du risque moyen (**point estimate of risk**) (Haas *et al.* 1999).

Le deuxième type d'AQR fait intervenir une approche **stochastique**, ou **probabiliste**. Cette méthode fait intervenir des distributions de probabilités de valeurs, et non une valeur en particulier. Le résultat s'exprimera alors sous la forme de distributions et/ou d'intervalles de confiance et/ou de crédibilité des valeurs recherchées (**interval estimates of risk**) (Haas, *et al.*, 1999). Le résultat est le plus souvent obtenu par simulations de Monte Carlo (Vose, 2000). Parmi ce second type d'AQR, on distingue des AQR **de premier ordre et du second ordre** (Vose, 2000).

Les AQR de premier ordre peuvent faire intervenir dans le résultat la variabilité et l'incertitude des paramètres, mais ne séparent pas variabilité et incertitude dans la présentation du résultat final (Vose, 2000). **Les AQR de second ordre** font intervenir la variabilité et l'incertitude qui se rattachent aux paramètres, et montrent, à l'aide de distributions de probabilité séparées, les effets de la variabilité et de l'incertitude sur le résultat final (Nauta, 2000 ; Pouillot, 2003 ; Vose, 2000).

3.4. Validation du modèle

La validation d'un modèle repose sur la comparaison entre données observées et prévues par un modèle. Il est nécessaire de confronter le plus possible certaines parties ou certains modules de la modélisation à des données observées (Haas *et al.*, 1999). Cela permet de valider ou d'améliorer le modèle le cas échéant. Par exemple, il est possible d'améliorer les connaissances sur les relations

dose-réponse par confrontation avec des données épidémiologiques (Gofti-Laroche, 2001). Il est parfois possible de confronter les résultats d'une appréciation de risque obtenus avec des données observées quand le résultat s'exprime, par exemple, sur un nombre de nouveaux cas de maladie, par an, sur une population définie (Eisenberg *et al.*, 2004).

Il faut aussi rappeler que les résultats d'une appréciation quantitative de risque sont obtenus dans un contexte bien précisé, sur des données particulières obtenues à un certain moment, d'une certaine manière, à un certain endroit, sur un nombre de données limitées, à partir d'un certain nombre d'hypothèses qui simplifient forcément la réalité (Haas *et al.* 1999). Ce constat limite **l'extrapolation** des résultats et il n'est pas étonnant d'aboutir parfois à un écart relatif avec l'observation (Haas *et al.*, 1999; OMS-OCDE, 2003), et de ce fait le résultat est parfois plutôt exprimé sous forme d'un ordre de grandeur (OMS, 2003b; OMS-OCDE, 2003; Petterson *et al.*, 2001 qui est en général suffisant pour répondre à des questions de gestion du risque.

L'observation ou l'estimation épidémiologique, par exemple, du nombre annuel de malades dans une population n'est pas non plus exempte de biais potentiels. Mais dans ce contexte, et comme pour les autres types de modélisation de phénomènes biologiques, il est important de souligner que les résultats d'une appréciation de risque devraient, quand cela est possible, être confirmés ou validés, tout ou partie, par d'autres sources d'informations, notamment épidémiologiques (Giovannini *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 1999; OMS-OCDE, 2003).

Enfin il ne faut pas négliger un autre aspect important des approches AQR. En tant que modélisation probabiliste, c'est aussi un outil de compréhension et de conceptualisation (Afssa, 2004) du risque, et donc aussi un outil de recherche, et d'orientation de celle-ci, tout autant qu'un outil de prévision et d'aide à la décision.

Globalement les appréciations quantitatives de risque publiées raisonnent sur le risque individuel. Ce risque est modulé selon le type de micro-organisme et les caractéristiques des personnes. La population ciblée par l'AQR est plus ou moins précise, par rapport à une population générale. Mais dans certaines AQR publiées, on distingue des facteurs comme l'âge, le statut immunitaire, la région d'origine. Une personne âgée ou immunodéprimée n'a pas le même risque d'infection, ni la même sévérité de symptômes vis à vis d'un certain nombre d'agents infectieux qu'un jeune adulte ou un enfant (Gerba *et al.*, 1996b).

4- Méthodologie du groupe de travail

Le groupe de travail a procédé à l'analyse des données actualisées de la littérature sur cette thématique et a participé, chacun pour ce qui le concerne, à l'avancée des travaux de chaque module.

L'ensemble de la réflexion est présentée sous forme de modules répartis dans trois chapitres (appréciation de l'exposition, appréciation des effets et estimation du risque), correspondant aux sous-parties de l'AQR. Parmi les avantages de cette présentation, on retiendra le fait de pouvoir justifier les choix opérés dans chaque module (cf. paragraphe 4.3.).

Les avancées des travaux du groupe ont fait l'objet de plusieurs discussions au sein du comité d'experts «Microbiologie» qui a validé le rapport le 9 octobre 2007.

4.1. Revue critique de la littérature

Les AQR concernant les STEC publiées à ce jour portent sur le couple *E. coli* O157:H7 et viande hachée de bœuf. La lecture critique des travaux publiés à l'étranger (Etats Unis¹ ; Pays Bas² et Canada³) a rapidement permis de conclure que ces AQR reposaient sur un grand nombre d'hypothèses discutables, différentes d'un modèle à l'autre, et qui sont non représentatives de la situation française. Ainsi, il a fallu construire la présente AQR en n'intégrant pas les maillons amont à la commercialisation de la viande hachée (l'élevage, l'abattoir, l'atelier de découpe et de hachage) compte tenu du fait que les données correspondant à ces étapes étaient manquantes ou insuffisantes pour la situation française. Le module 1 met en évidence ces lacunes en amont de la filière et plus précisément en élevage.

De plus, le contexte épidémiologique des infections à STEC en France a été étudié pour étayer le choix du groupe. Le document majoritairement utilisé a été le rapport « Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France »-Afssa-InVS, mars 2004:

- *Salmonella* : entre 92 à 535 décès estimés par an ;
- *Listeria monocytogenes* : 78 décès estimés par an ;
- *STEC* : entre 0 et 1 décès estimé par an.

Les STEC sont associés à un faible nombre de décès. Le taux de mortalité à la phase aiguë est actuellement inférieur à 5 % et le pronostic vital est en cause dans les cas ayant une atteinte multiviscérale incluant le système nerveux central. Mais il nous faut insister sur les séquelles gravissimes (surtout rénales) observées chez les jeunes enfants ayant développé un syndrome hémolytique et urémique. En effet, 5 à 10 % des enfants malades évoluent vers l'insuffisance rénale terminale, rarement d'emblée, le plus souvent après avoir retrouvé une certaine fonction rénale avec une insuffisance rénale chronique pendant quelques années. Après 5 à 10 ans de recul, seulement 40 à 65 % des enfants n'ont pas de séquelles rénales évidentes (pas de protéinurie, pas d'hypertension, taux de créatinine sanguine normal). Néanmoins, après 15 années ou plus de recul, 20 à 40 % des patients (et jusqu'à 60 %) ont une protéinurie et/ou une hypertension artérielle ; et certains d'entre eux (jusqu'à 20 %) développent une insuffisance rénale chronique ou terminale. Ces problèmes peuvent apparaître après plusieurs années de guérison apparente. Ainsi la question de l'intérêt de tenter une AQR sur *E. coli* O157:H7 et les steaks hachés en France doit rester posée.

4.2. Données nouvelles et renforcement de l'approche STEC AQR

Au cours de la réflexion du groupe de travail (AQR STEC), une épidémie d'infections à *E. coli* O157:H7 est survenue en France en fin d'année 2005. Les résultats de l'investigation de cette épidémie, présentés ci-dessous (King *et al.* 2007) ont été à l'origine d'un recentrage de l'AQR sur certains axes et ont fourni au groupe de travail des données d'exposition très utiles.

Soixante neuf cas ont été identifiés avec une infection à *E. coli* O157:H7 liée à la consommation de steaks hachés surgelés de bœuf de la même marque entre le 5 octobre et le 3 novembre 2005.

Dix-sept personnes ont présenté un syndrome hémolytique et urémique (SHU), 33 une diarrhée sanglante et 19 une diarrhée non sanglante liée à infection à *E. coli* O157:H7 confirmée. Seize des 17 cas de SHU étaient des enfants de 2 à 9 ans. Quarante-six patients ont été hospitalisés : 17 avec un SHU, 22 avec une diarrhée sanglante et 7 avec une diarrhée non sanglante. Tous les patients avaient consommé du steak haché de bœuf surgelé de la même marque au cours des 7 jours précédant le début de leurs symptômes.

¹ Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef – FSIS-USDA – report 00-023N / 2001

² Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands - RIVM report 257851003/2001

³ Cassin M. H.; Lammerding, A. M.; Todd, E. C. D.; Ross, W.; McColl, R. S. 1998 Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int. J. Food Microb.* 41 21-44

Cinquante steaks (prélevés chez 7 familles) parmi les 60 analysés ont permis l'isolement de *E. coli* O157:H7 avec des dénombrements allant de moins de 5 bactéries par gramme à 30 bactéries par gramme. D'autre part, 12 steaks hachés prélevés chez le distributeur ou directement chez l'industriel producteur ayant des produits dans son échantillothèque et provenant des lots suspectés se sont révélés contaminés par *E. coli* O157:H7.

La comparaison par électrophorèse en champ pulsé des isolats provenant des échantillons de selles des malades et dans des échantillons de steaks hachés a permis de conclure que ces isolats étaient génétiquement reliés et qu'ils correspondaient à la même souche.

La survenue de cette épidémie impliquant des steaks hachés surgelés de bœuf contaminés par *E. coli* O157:H7 a donc pleinement justifié et orienté l'AQR vers « *E. coli* O157:H7-steaks hachés industriels en France ». Plus précisément le groupe de travail a décidé de mener sa réflexion en utilisant comme matrice alimentaire la viande hachée industrielle de bœuf surgelée. Ce choix a été justifié par les 3 éléments suivants : le tonnage de viande hachée surgelée produit en France est significativement plus important que celui des viandes hachées réfrigérées (conditionnées sous vide ou sous atmosphère modifiée), l'épidémie de 2005 était liée à de la viande hachée surgelée, enfin le groupe de travail ne disposait d'aucune donnée bibliographique sur la croissance de *E. coli* O157:H7 dans de la viande hachée réfrigérée conditionnée (cette croissance a été considérée comme nulle dans la viande surgelée).

Enfin, pour pouvoir coller au mieux à l'épidémie de 2005, c'est la consommation de la viande hachée au domicile familial qui a été choisie avec une cuisson à la poêle avec un seul retournement du steak.

4.3. Organisation du rapport

Le rapport est divisé en 3 chapitres, eux mêmes sub-divisés en modules. Il s'agit :

* Le module n°1 « Amont de la filière » qui concerne l'élevage, le transport, l'abattoir, et la découpe. Comme précisé dans le paragraphe 4.1 (Revue critique de la littérature), ce module est placé en préambule de l'analyse compte tenu de l'absence de données utilisables pour abonder l'AQR. Cependant, il est important de garder ces éléments dans le corps du rapport car ils mettent en évidence les lacunes en termes de données en amont de la filière.

Chapitre I: Appréciation de l'exposition

* Le module n°2 « Prévalence et niveau de contamination » qui développe la contamination des steaks hachés industriels de bœuf par *E. coli* O157:H7 et estime le niveau de contamination des steaks hachés industriels en France hors épidémies et lors de l'épidémie survenue en 2005.

* Le module n°3 « Consommation » qui expose les données de consommation utilisées, estime la consommation de steaks hachés dans la population française (portions ingérées et consommation de steaks hachés).

* Le module n°4 « Enquête sur les habitudes de cuisson des steaks hachés consommés par les enfants de moins de 16 ans ».

* Le module n°5 « Destruction thermique ».

Chapitre II: Appréciation des effets

* Le module n°6 « Loi dose/réponse » qui précise les données provenant d'infections expérimentales, celles provenant d'épidémies, les modèles utilisés, la relation maladie-SHU-décès et discute des limites liées aux données expérimentales et aux données d'épidémies.

Chapitre III: Estimation du risque

* Le module n°7 « Appréciation quantitative des risques » divisé en l'étape 1 permettant la construction d'un modèle d'AQR et sa confrontation aux données de l'épidémie française de 2005, l'étape 2 établissant des lois dose-réponse chez enfants de moins de 10 ans à partir des données de l'épidémie de 2005 et une étape 3 simulant de divers scénarios à partir des modèles dose-réponse retenus pour chaque classe d'âge.

-Par souci de clarté ces modules seront replacés dans un schéma général représentant les différentes étapes de l'AQR que le groupe de travail a mené à bien, en tête de chaque chapitre.

-Certains passages d'ordre mathématique sont de compréhension difficile. La lecture de ces parties en petits caractères n'est pas indispensable au lecteur non spécialiste dans la compréhension du document. Les conclusions importantes de chaque paragraphe sont placées en encadrés.

Au regard des discussions et de la difficulté à modéliser la croissance d'*E. coli* O157:H7 dans les steaks hachés réfrigérés (il n'existe aucun modèle de croissance de *E. coli* O157:H7 pour les viandes hachées réfrigérées conditionnées sous vide ou sous atmosphère modifiée) et parce que des steaks hachés de bœuf surgelés ont été à l'origine de l'épidémie survenue en 2005, le groupe de travail a acté de restreindre son champ d'étude aux steaks hachés surgelés qui représentent également la part de consommation hors foyer et familiale la plus importante en France.

L'investigation de cette épidémie a permis d'obtenir des données sur le niveau de contamination des steaks hachés consommés et sur le nombre de SHU survenus au cours de cet épisode. Cela a permis de recentrer la loi dose/maladie sur une loi dose-SHU.

Concernant les objectifs de l'AQR, les questions suivantes ont été proposées :

Quelle est la probabilité, pour un enfant de moins de 16 ans, de développer un SHU dans un contexte sporadique ou épidémique en consommant en restauration familiale du steak haché surgelé, issu de la filière industrielle française ?

Quels sont les leviers d'action utilisables pour la gestion de ce risque ?

Module n°1 :élevage, transport, abattage, découpe

Les maillons : élevage, transport, abattage, découpe ne pourront être introduits dans la présente AQR du fait de l'absence de données quantitatives françaises et compte tenu de la spécificité française qui ne nous permet pas d'utiliser les hypothèses formulées dans les AQR existantes. Quelques données de prévalence au stade de l'élevage ou de l'abattage sont en effet disponibles mais peu de données comportant des dénombrements. La partie qui suit est une démonstration de cette assertion.

Rappelons tout d'abord que les 3 AQR existantes qui ont servi de support à cette analyse critique sont les suivantes :

***Etats-Unis** – Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef – FSIS-USDA – report 00-023N / 2001

***Pays-Bas** – Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands - RIVM report 257851003/ 2001

* **Canada** - Cassin M. H.; Lammerding, A. M.; Todd, E. C. D.; Ross, W.; McColl, R. S. 1998 Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. Int. J. Food Microb. 21-44.

1- En élevage

Il s'agit dans ce paragraphe, de présenter les principales hypothèses retenues par les auteurs des 3 AQR et, quand c'est possible, de faire un parallèle avec la situation française. Les différentes hypothèses sont :

1 – La prévalence du portage diffère selon les types et les catégories de bovins.

Données issues des 3 AQR citées ci-dessus :

Les auteurs américains estiment la prévalence du portage pour, d'une part, les bovins à l'engraissement (feedlot), et d'autre part les bovins d'élevage (laitier ou allaitant) (breeding cattle). Dans l'étude néerlandaise, la prévalence du portage est estimée pour les jeunes bovins à l'engraissement, les vaches laitières et les veaux de boucherie. Les auteurs canadiens excluent les veaux de leur analyse. Compte tenu des données disponibles et des conditions de production dans ces deux pays, cette hypothèse d'une prévalence de portage différente selon les types et catégories de bovins, paraît pertinente.

Données françaises :

En France, très peu de données publiées sont actuellement disponibles sur la prévalence dans les cheptels. Une référence (Rogerie *et al.*, 2001) distingue les élevages intensifs et extensifs, et fait état d'une prévalence moins élevée pour les jeunes bovins (contrairement aux références américaines). Il faudrait évaluer, au niveau des abattoirs, la part des différents types et catégories d'animaux intervenant dans la fabrication des steaks hachés industriels. L'utilisation de certaines pièces de découpe pouvant provenir de tous les types et catégories d'animaux rend cette estimation difficile voire impossible.

2 – Les animaux importés (vivants et carcasses) ont le même statut épidémiologique que les animaux autochtones (AQR américaine).

Données issues des 3 AQR citées ci-dessus :

Cette hypothèse de statut épidémiologique identique paraît pertinente aux Etats-Unis car les données disponibles n'indiquent pas de grandes différences de prévalences pour *E. coli* O157:H7 entre le bétail autochtone et le bétail importé. On ne sait pas si les mêmes observations peuvent être faites aux Pays-Bas. Pour ce pays, le modèle s'applique aux viandes produites aux Pays Bas et exclut les viandes importées (mais pas le bétail importé qui représenterait environ 5 % des animaux abattus). Les auteurs canadiens font remarquer que cette hypothèse n'est pas prise en compte dans leur modèle, ce qui en fait une de ses faiblesses.

Données françaises :

En France, il n'y a que peu d'importations d'animaux vivants pour la transformation directe en viande hachée (sauf zones frontalières), et il est possible que les prévalences et les dénombrements de *E. coli* O157:H7 soient différentes entre le bétail autochtone et le bétail importé. La quantité, la provenance et le statut des importations de carcasses, de pièces de découpe et de viandes hachées ne sont pas connus précisément à ce jour (faute d'une synthèse des données disponibles auprès des industriels).

3 – La prévalence « vraie » peut être estimée à partir des prévalences observées.

Données issues des 3 AQR citées ci-dessus :

La prévalence du portage est estimée à partir des prévalences inter et intra troupeaux et la prévalence « vraie » est modélisée dans l'étude américaine. Dans l'étude néerlandaise, les auteurs ne distinguent pas prévalence mesurée et « vraie » prévalence. La prévalence moyenne au niveau des animaux est estimée à partir des prévalences moyennes inter troupeaux positifs et négatifs et des prévalences moyennes intra troupeau. Cette hypothèse paraît pertinente car les données sont relatives aux prévalences « à la ferme ». Il n'existe pas de données de prévalence avant l'abattage, sauf pour les veaux de boucherie (prévalences nulles). Dans l'étude canadienne, les auteurs ne font pas non plus de différence entre « vraie » prévalence et prévalence observée.

Données françaises :

En France, seules quelques données intra troupeaux sont actuellement disponibles. Ces données intra troupeaux existantes (Raynaud *et al.*, 2005) portent sur de très faibles effectifs (10% du troupeau) et concernent uniquement les élevage laitiers, ce qui est insuffisant compte tenu de l'utilisation possible de viande d'autres types ou catégories d'animaux dans la filière viande hachée.

4 - La prévalence du portage varie selon la saison (AQR américaine).

Données issues des 3 AQR citées ci-dessus :

Compte tenu des données disponibles aux USA, cette hypothèse paraît pertinente.

Les variations de prévalence saisonnières, géographiques, et liées à l'alimentation des cheptels ne sont prises en compte ni dans le modèle canadien, ni dans le modèle hollandais.

Données françaises :

En France, des variations saisonnières ont pu être identifiées sur les animaux arrivant à l'abattoir (Andral *et al.*, 2004) mais les données disponibles sont là encore peu nombreuses.

5 – La prévalence est estimée seulement à partir du portage fécal, et non du portage par les cuirs (AQR américaine).

La pertinence de cette hypothèse peut être remise en question car on ne dispose pas de données sur la prévalence et la quantification du portage par les cuirs en France. Le portage par les cuirs peut pourtant être une source de contamination des animaux lors du transport et du parcage avant l'abattage, et donc des carcasses au cours de la dépouille (bien que l'on dispose de quelques données de portage fécal (Rogerie *et al.* 2001)). Récemment, une étude menée en Irlande a montré que *E. coli* O157:H7 pouvait être plus souvent retrouvée sur des chiffonnages de cuirs que dans les fèces des bovins, y compris ceux prélevés le même jour sur les animaux d'une même case (McGee *et al.*, 2004).

En France, les données disponibles sur les cuirs concernent :

- 1- le portage de coliformes et de salmonelles par les cuirs sur animaux vivants avant l'abattage,
- 2- l'étude des relations avec la contamination des carcasses (Cartier *et al.*, 1993 et 1994),
- 3- la propreté visuelle des bovins à l'entrée à l'abattoir (Lucbert *et al.*, 2005).

On ne sait pas si ces données peuvent être un indicateur de situation par rapport aux *E. coli* O157:H7. Il est également possible de supposer que la situation de la France n'est pas très différente de celle d'autres pays, et utiliser les données des publications étrangères (O'Brien *et al.*, 2005 ; Fegan *et al.*, 2005 ; Koohmaraie *et al.*, 2005) mais ceci reste discutable du fait des statuts épidémiologiques différents des cheptels bovins des différents pays européens.

6 – La sensibilité du test dépend à la fois du nombre d'animaux (ou de fèces par animal) testés en intra-troupeaux et de la sensibilité de la méthode d'analyse (AQR américaine).

Cette hypothèse paraît pertinente mais se heurte là encore à la faiblesse des données disponibles en France, voire au manque de références pour évaluer la sensibilité des méthodes d'analyses.

7 – Les quantités de bactéries présentes dans les fèces sont connues et la contamination des carcasses est modélisée à partir de données de prévalence et de concentration de la contamination fécale

Face au manque de données de dénombrement dans leur pays, les auteurs néerlandais utilisent des données américaines pour prendre en compte l'effet de la quantité de bactéries présentes dans les fèces sur celles retrouvées sur les carcasses. Les auteurs de l'étude canadienne prennent en compte la prévalence du portage et la concentration en bactéries dans les fèces, mais les données de concentration dans les fèces utilisées portent sur peu de données et sur une seule étude (la même que celle utilisée par les hollandais). Aucune hypothèse n'est faite dans l'étude américaine sur les quantités de bactéries présentes dans les fèces, ni par conséquent sur l'incidence de ces quantités sur celles retrouvées sur les carcasses.

Il nous paraîtrait pertinent de prendre en compte cette hypothèse, mais en France, il n'existe pas de données de dénombrement de *E. coli* O157:H7 dans les fèces de bovins. Quelques études étrangères publiées postérieurement à ces AQR pourraient peut-être permettre une estimation de ces quantités de bactéries (Fegan *et al.*, 2004 ; Robinson *et al.*, 2004 ; Fegan *et al.*, 2005 ; Robinson *et al.*, 2005 ; Strachan *et al.*, 2005), mais nous n'avons aucune certitude que la situation de la France soit similaire à celle de ces pays.

Par ailleurs, les auteurs de l'étude américaine font l'hypothèse d'une bonne corrélation entre la prévalence du portage fécal des animaux et celle des carcasses. Cette affirmation repose sur les données et le modèle de Elder *et al.* (2000), qui ne sont pas discutés.

En France, les pratiques d'abattage sont différentes de celles des Etats-Unis et cette hypothèse ne serait peut-être pas pertinente. En effet, une publication française fait état de 4 animaux porteurs de *E. coli* O157:H7 dans leur fèces, sans que l'on en retrouve sur leurs carcasses (Rogerie *et al.*, 2001). Une étude irlandaise fait état du même phénomène (Minihan *et al.*, 2003). D'autre part, la contamination faible et aléatoire des carcasses rend l'évaluation de leur contamination délicate.

2- Rôle du transport

1 – Le transport n'a pas d'incidence sur la prévalence du portage fécal (AQR américaine).

Les données évoquées portent sur la prévalence et non sur le dénombrement. Il n'est pas exclu que le transport puisse accroître les quantités excrétées.

2 – Le portage par les cuirs n'est pas pris en compte (AQR américaine).

Les auteurs signalent que l'importance du portage par les cuirs mériterait d'être évaluée.

En France, une étude a dénombré la flore totale, les entérobactéries et les *Pseudomonas* à partir de prélèvements de poils à la ferme, à l'arrivée à l'abattoir, à la sortie de la bouverie et avant arrachage du cuir sur 63 animaux (Cartier *et al.*, 1994). Cette étude a montré une relative stabilité du niveau moyen de contamination d'un lot d'animaux du départ de l'élevage jusqu'à la sortie de la bouverie. Paradoxalement, le transport semble induire une légère chute des contaminations. L'attente en bouverie à l'inverse semble entraîner une légère augmentation des contaminations.

Le transport n'est pas pris en compte dans le modèle hollandais, ni dans le modèle canadien. Les auteurs de ce dernier font observer que c'est une des limites de leur modèle.

3- Stade abattoir /découpe

Les conditions d'abattage diffèrent entre les Etats-Unis et la France, en particulier, la cadence d'abattage, la maîtrise continue de l'éviscération, l'existence pour les premiers de procédures de décontamination en fin de chaîne et pour la France une meilleure maîtrise de l'hygiène lors des opérations d'habillage liée à une réglementation très stricte. Il en résulte que la contamination fécale des viandes aux USA est importante à la fois par le tube digestif et par le cuir des animaux ; alors qu'en France, la contamination serait limitée à celle provenant des cuirs. En cela, les éléments issus de la publication hollandaise seraient plus proches de la situation française.

Les publications scientifiques sous-entendent une bonne corrélation entre la contamination des cuirs et le portage fécal, mais celle-ci n'est pas, à ce jour, démontrée par des enquêtes épidémiologiques et les données quantitatives (contamination par les STEC) n'existent que pour les fèces.

4- Conclusions

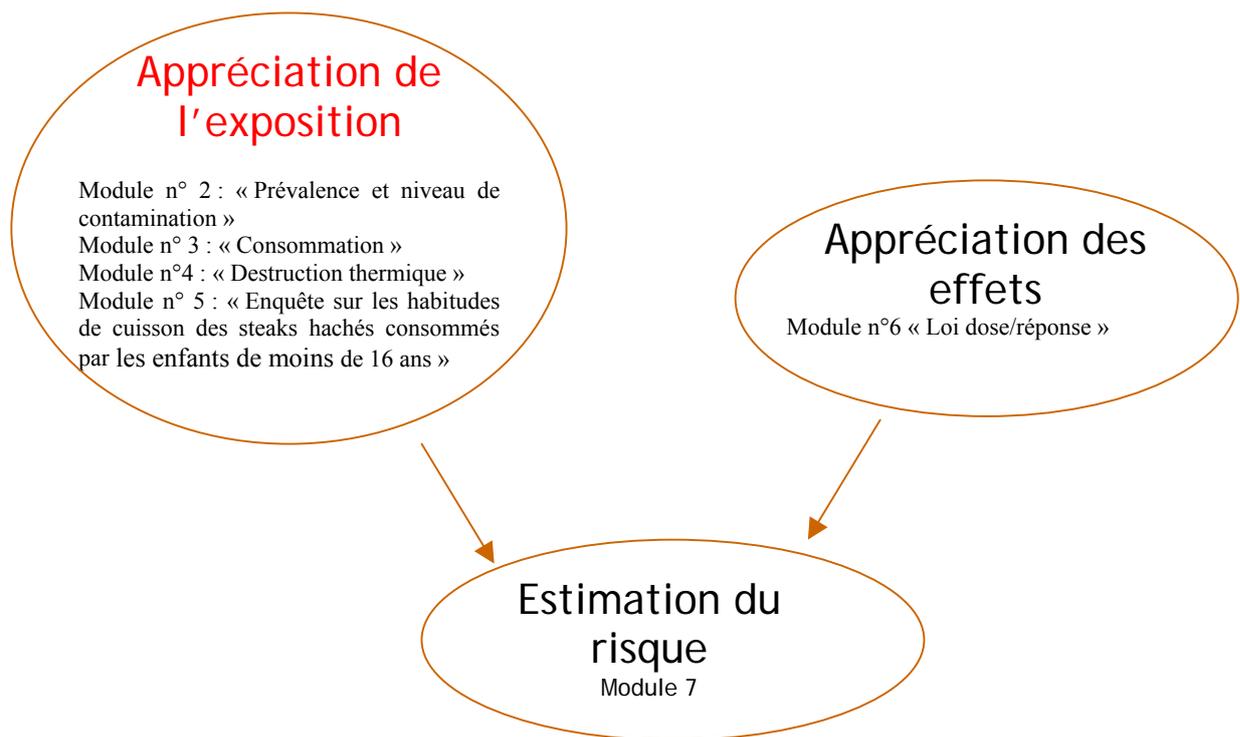
Les hypothèses variées posées par les auteurs de ces 3 AQR, ainsi que les extrapolations et modélisations de certaines données, donnent une idée de la faiblesse des données disponibles aujourd'hui sur l'amont de la filière viande bovine, notamment en ce qui concerne la quantification de la contamination en *E. coli* O157:H7.

D'autre part, en l'état actuel des connaissances scientifiques françaises portant sur l'origine de la viande entrant dans la fabrication des steaks hachés, les différences d'excrétion entre les différentes catégories et types d'animaux, les variations de l'excrétion (saisonnaire ou autre) les contaminations croisées entre animaux et avec le matériel, le portage par les cuirs, l'absence de données sur les prévalences de portage intra-troupeau et la concentration en bactéries, il ne nous a pas paru pertinent de prendre en compte l'amont de la filière dans la présente AQR.

Pour mener à bien une telle démarche, il nous faudrait au minimum disposer de données quantitatives représentatives de la situation française avec notamment des dénombrements de *E.*

coli O157:H7 dans la matière fécale, sur le cuir et sur les carcasses de différents types et catégories de bovins utilisées dans la filière viande hachée. Certaines de ces données sont en cours d'acquisition et permettront peut-être d'étendre dans quelques années la démarche d'AQR à la partie élevage, transport, abattage et découpe.

Chapitre I : Appréciation de l'exposition



Module n°2 : Prévalence et niveau de contamination des viandes hachées de boeuf

1- Production de viande hachée de bœuf en France

Les viandes hachées sont des viandes qui ont été seulement soumises à une opération de hachage le plus souvent par passage dans un hachoir à vis sans fin. La viande hachée de bœuf est fabriquée exclusivement à partir de viande : le muscle et son gras. L'ajout d'aucun autre ingrédient que le chlorure de sodium (sel) n'est autorisé.

La fabrication de la viande hachée de bœuf répond à des règles sanitaires et de composition⁴ très strictes harmonisées au plan communautaire ainsi que d'un code des usages, c'est à dire un cahier des charges professionnel validé par les Pouvoirs publics. Les entreprises qui élaborent la viande hachée de bœuf sont agréées par les services vétérinaires pour l'activité spécifique « viande hachée » et sont strictement contrôlées.

D'une manière générale, les matières premières doivent provenir exclusivement d'ateliers de découpe agréés pour la mise sur le marché communautaire et être utilisées dans un délai de six jours maximum après abattage pour la viande réfrigérée, neuf jours maximum après abattage pour la viande bovine désossée conditionnée sous vide (sous réserve d'un conditionnement dans les quatre jours suivant l'abattage), 18 mois pour la viande bovine surgelée. L'utilisation de viandes (mineraï) congelées est interdite dans la fabrication des viandes hachées réfrigérées, elle est réservée à la fabrication de viande hachée surgelée ou congelée.

Le mineraï ou mineraï de chair utilisé pour la fabrication des viandes hachées correspond exclusivement à des ensembles de muscles striés et de leurs affranchis (morceaux de viande produits exclusivement lors de la découpe (désossage, parage et piéçage) et débarrassés des aponévroses et des ganglions lymphatiques. Les viandes hachées ne peuvent être préparées à partir de chutes de découpe ou de parage.

Les pièces interdites sont : les chutes de découpe ou de parage, il faut entendre les morceaux souillés, tombés au sol, porteurs d'ecchymoses, de points de sang, les mélanges de gras, d'aponévroses et de chutes de découpe, ainsi que les déchets de parage (les viandes de la tête, la partie non musculaire de la ligne blanche et la région du carpe et du tarse).

Pour obtenir le taux de matières grasses souhaité (5, 10, 15 %, etc.) - celui indiqué sur l'étiquette – le professionnel assemble différents muscles qui diffèrent naturellement par leur teneur en matière grasse. L'étiquetage de la viande hachée comporte obligatoirement l'indication de son taux de matières grasses et du rapport collagène/protéines totales, critère technique garantissant la teneur en protéines dites nobles.

La filière française de viande hachée industrielle de bœuf a produit 275 000 tonnes en 2006. Cette production se répartit comme suit :

- 100 000 tonnes de viande hachée réfrigérée (conditionnement sous air, sous vide et sous atmosphère modifiée) et
- 175 000 tonnes de viande hachée surgelée.

Cette filière est plus ou moins intégrée, certains industriels étant impliqués dans l'abattage, découpe et hachage des viandes et d'autres s'approvisionnant directement en carcasses de bœuf ou minerais.

⁴ Règlements CE/2076/2005 et CE/853/2004

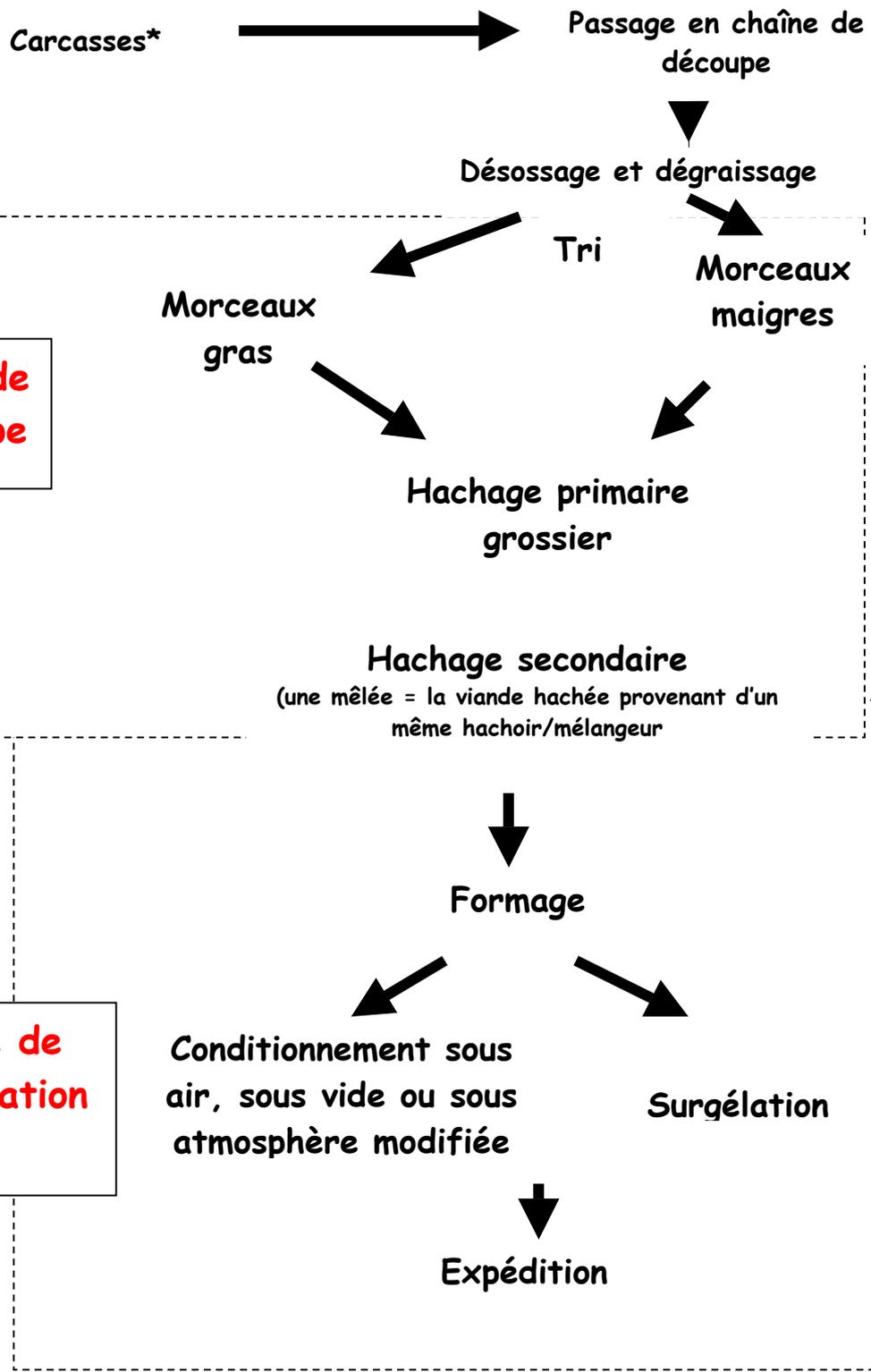


Figure 1 : Schéma de fabrication de la viande hachée industrielle

*L'utilisation de viandes (minéral) congelées est interdite dans la fabrication des viandes hachées réfrigérées, elle est réservée à la fabrication de viande hachée surgelée ou congelée.

2- Contamination des steaks hachés industriels de bœuf par *E. coli* O157:H7 : Revue de la littérature

2.1. Prévalences citées dans la littérature:

Plusieurs études de prévalence ont été réalisées à l'échelon international :

En France en 1999 : Vernozzy Rozand *et al.* 2002 ont détecté *E. coli* O157:H7 dans 4 échantillons de viande hachée de 100g chacun prélevés directement dans les hachoirs. Au total, 3450 échantillons ont été prélevés chez les trois industriels partenaires de l'étude. La prévalence observée de contamination de la viande hachée était donc de 0,12 % [0,03% - 0,30%]. Pour chaque valeur estimée de la prévalence nous indiquons l'intervalle de confiance à 95% correspondant calculé à l'aide du logiciel R par la méthode de Clopper et Pearson (1934).

Plus précisément, 115 mêlées ont fait l'objet d'une analyse. Pour chacune d'elles, 30 échantillons de 100g ont été prélevés. Pour chaque échantillon, une prise d'essai de 25 g de viande hachée a réellement fait l'objet d'une détection d'*E. coli* O157:H7 après enrichissement. Parmi les 4 steaks contaminés, 2 appartenaient à la même mêlée. Donc, *in fine*, 3 mêlées étaient contaminées par *E. coli* O157:H7. La prévalence observée de contamination des mêlées était par conséquent de 2,6 % des mêlées (3/115) [0,54% - 7,4%].

En Argentine, Chinen *et al.* (2001) ont détecté 6 steaks hachés réfrigérés contaminés fabriqués en boucherie de détail parmi les 160 testés, soit une prévalence de contamination de 3,8 % [1,4% - 8.0%].

Une étude similaire faite en Suisse par Fantelli et Stephan (2001) a montré une contamination de 5 steaks parmi les 211 testés (prévalence de contamination de 2,3 % [0,77% - 5,4%]).

Au Royaume Uni, Chapman *et al.* (2000) ont détecté 36 steaks hachés réfrigérés contaminés parmi les 3216 testés d'où une prévalence moyenne de 1,1 % [0,78% - 1,54%]. Les steaks avaient été prélevés en supermarché et boucherie de détail et la prévalence de contamination observée était plus élevée en juillet (4%) qu'en hiver (0,2 %).

En Hollande, Heuvelink *et al.* 1999 ont trouvé une prévalence de contamination des steaks hachés réfrigérés de 1,1 % (6/571) [0,49% - 2,5%].

Aux Etats-Unis, les prévalences étaient de 16,8 % [12,8% - 21,6%] sur 296 steaks hachés réfrigérés à Washington selon Samadpour *et al.* (2002) et de 0 % [0% - 0,21%] sur les 1400 steaks réfrigérés analysés par Tarr *et al.* (1999) à Seattle.

Dans d'autres études, une quantification du pathogène a été réalisée.

2.2. Quantification des *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée industrielle de bœuf

2.2.1. Méthode NPP (nombre le plus probable)

Bolton *et al.* (1996) ont dénombré *E. coli* O157:H7 dans de la viande hachée réfrigérée prélevée directement en supermarché et ont obtenu des dénombrements allant de -0,5 à 0,6 log₁₀ ufc/g (<0,3 à 4 ufc/g), mais un échantillon était contaminé à 3,36 log₁₀ ufc/g (rupture de la chaîne du froid supposée).

Tuttle *et al.* (1999) ont dénombré, quant à eux, *E. coli* O157:H7 dans de la viande hachée provenant d'un abattoir approvisionnant une restauration rapide elle-même impliquée dans une épidémie. Soixante seize steaks ont été analysés et les dénombrements s'étagaient de -0,52 à 1,18 log₁₀ ufc/g (<0,3 à 15 ufc/g).

2.2.2. Méthode par dilutions décimales et dénombrement de colonies caractéristiques sur milieux spécifiques

Cagney *et al.* (2004) ont réalisé une étude sur une durée de 13 mois en Irlande pour déterminer les contaminations des steaks hachés frais (conditionnés ou non) ou surgelés vendus par les bouchers ou par les supermarchés.

Quarante trois steaks étaient contaminés par *E. coli* O157:H7 parmi les 1533 testés d'où une prévalence de contamination globale de 2,80 % [2,0% - 3,7%]. Cette prévalence n'était pas liée au type de steaks hachés analysés, mais elle était plus importante en mars (8%). L'origine des steaks positifs se répartissait comme suit : 32 supermarchés sur 1183 testés et 11 bouchers sur 350 testés.

Les nombres de *E. coli* O157:H7 dans 21 des 43 échantillons positifs allaient de < 0,52 à 4,03 log₁₀ ufc/g avec une moyenne de 0,91 log₁₀ ufc/g.

Trois steaks hachés réfrigérés présentaient une contamination importante avec plus de 3,00 log₁₀ ufc/g.

Dans les 22 autres steaks positifs, la détection de *E. coli* O15:H7 n'a pu être réalisée qu'après enrichissement (< 0,52 log₁₀ ufc/g). Notons que les steaks hachés surgelés positifs faisaient tous partie de cette dernière catégorie. D'autre part *E. coli* O157:H7 a été indifféremment détecté dans des steaks réfrigérés (conditionnés ou non) ou surgelés.

3- Estimation du niveau de contamination des steaks hachés industriels en France

3.1 Estimation du niveau de contamination hors épidémies

L'étude de Vernozzy-Rozand *et al.* (2002) réalisée sur trois sites de production français peut être utilisée pour estimer la prévalence de contamination des mêlées et le niveau de contamination de celles-ci (cf. données indiquées plus haut).

Estimation de la prévalence

On peut d'après ces données estimer la prévalence de contamination au niveau des mêlées à 2,6% des mêlées. Il est néanmoins important de quantifier l'incertitude sur cette prévalence estimée. D'après les résultats théoriques publiés par Miconnet *et al.* (2005), il semble raisonnable de tenir compte de

l'incertitude sur la prévalence estimée par une loi bêta en prenant comme *a priori* la loi bêta $\left(\frac{1}{2}; \frac{1}{2}\right)$, c'est-à-dire la loi : $\text{bêta}(3 + 0,5; 115 - 3 + 0,5) = \text{bêta}(3,5; 112,5)$.

Estimation du niveau de contamination

La répartition d'une population bactérienne dans une mêlée de viande hachée est communément considérée homogène, ce qui permet de décrire la distribution du nombre de bactéries par unité de masse par une loi de Poisson. En effet, d'après Reinders *et al.* (2003), il semblerait que la répartition des bactéries pathogènes dans une mêlée de viande hachée ne puisse être modélisée par une loi de Poisson qu'après deux hachages. Or dans la pratique industrielle française, le hachage est effectivement précédé d'un pré-hachage grossier ce qui conforterait l'utilisation d'une loi de Poisson. Par ailleurs Toft *et al.* (2006) préconise l'utilisation d'une loi de Poisson pour modéliser la répartition des bactéries pathogènes dans la viande hachée, considérant qu'on n'a généralement pas suffisamment de données de dénombrement bactérien pour paramétrer une loi plus complexe. En supposant que toutes les mêlées contaminées le sont au même niveau (hypothèse simplificatrice justifiée par le manque de données) et qu'au sein de ces mêlées la répartition est homogène, on peut estimer le paramètre λ de la loi de Poisson (nombre théorique moyen de bactéries par échantillon de 25g) à partir du nombre d'échantillons positifs (4) sur les 90 échantillons prélevés dans les mêlées positives par $\lambda = -\ln(1 - 4/90) = 0,0455$. Ainsi on obtient une

estimation du niveau de contamination dans les m \acute{e} l \acute{e} es contamin \acute{e} es de $1,8 \cdot 10^{-3}$ ufc.g $^{-1}$ avec un intervalle de confiance \acute{a} 95% calcul \acute{e} par le « MPN calculator » (<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>) de [$6,8 \cdot 10^{-4}$; $4,8 \cdot 10^{-3}$].

Estimation commune de la pr \acute{e} valence et du niveau de contamination

A partir des donn \acute{e} es de Vernozy-Rozand *et al.* (2002), nous avons pr \acute{e} c \acute{e} demment estim \acute{e} s \acute{e} par \acute{e} ment la pr \acute{e} valence des m \acute{e} l \acute{e} es contamin \acute{e} es et le niveau de contamination au sein de ces m \acute{e} l \acute{e} es. Dans ces calculs il a \acute{e} t \acute{e} suppos \acute{e} que seules les m \acute{e} l \acute{e} es pr \acute{e} sentant au moins un \acute{e} chantillon positif sur 30 \acute{e} taient contamin \acute{e} es. Or si l'on suppose qu'une m \acute{e} l \acute{e} e est contamin \acute{e} e \acute{a} la concentration estim \acute{e} e de $1,8 \cdot 10^{-3}$ bact \acute{e} ries par gramme, celle-ci a une probabilit \acute{e} de 25 % de ne pr \acute{e} senter aucun \acute{e} chantillon contamin \acute{e} parmi les 30 pr \acute{e} lev \acute{e} s, d'apr \acute{e} s la loi de Poisson. Il est donc possible qu'une ou plusieurs m \acute{e} l \acute{e} es contamin \acute{e} es au m \acute{e} me niveau que les autres soient compt \acute{e} es comme non contamin \acute{e} es ce qui induit une sous-estimation possible de la pr \acute{e} valence au sein des m \acute{e} l \acute{e} es.

Une approche bay \acute{e} sienne a donc \acute{e} t \acute{e} envisag \acute{e} e pour tenter d'estimer globalement la pr \acute{e} valence et le niveau de contamination ainsi que l'incertitude sur ces 2 param \acute{e} tres en prenant en compte cette remarque. Le logiciel BRugs (Thomas *et al.*, 2006) a \acute{e} t \acute{e} utilis \acute{e} en prenant comme distribution *a priori* sur la pr \acute{e} valence toujours la loi

$beta\left(\frac{1}{2}; \frac{1}{2}\right)$ et comme distribution *a priori* sur le niveau de contamination exprim \acute{e} en $\log_{10}[ufc.g^{-1}]$ la loi peu

informative $N(-3; 1,5)$. On s'aper \acute{c} oit en faisant tourner BRugs sur un tr \acute{e} s grand nombre d'it \acute{e} rations que les cha \acute{i} nes de Markov simul \acute{e} es ne se stabilisent jamais et qu'elles vont et viennent entre une faible pr \acute{e} valence et une pr \acute{e} valence de 1. Dans ces cha \acute{i} nes une forte corr \acute{e} lation entre les valeurs de pr \acute{e} valence et de niveau de contamination est observ \acute{e} e. Il semble donc que les donn \acute{e} es dont on dispose ne permettent pas de savoir si toutes les m \acute{e} l \acute{e} es sont contamin \acute{e} es avec la m \acute{e} me concentration tr \acute{e} s faible ou si seules quelques unes sont contamin \acute{e} es avec une contamination un petit peu plus forte. Peut- \acute{e} tre est-il alors raisonnable de simplifier le mod \acute{e} le en enlevant un param \acute{e} tre (la pr \acute{e} valence) et en supposant que toutes les m \acute{e} l \acute{e} es sont tr \acute{e} s faiblement contamin \acute{e} es au m \acute{e} me niveau. Ce mod \acute{e} le simplifi \acute{e} a \acute{e} t \acute{e} utilis \acute{e} sur ces donn \acute{e} es en prenant la m \acute{e} me distribution *a priori* sur le niveau de contamination que pr \acute{e} c \acute{e} demment. On obtient ainsi une estimation de la concentration commune \acute{a} toutes les m \acute{e} l \acute{e} es de $5 \cdot 10^{-5}$ ufc.g $^{-1}$ assortie d'un intervalle de cr \acute{e} dibilit \acute{e} \acute{a} 95% de [$1,5 \cdot 10^{-5}$; $1,0 \cdot 10^{-4}$].

Dans le cadre de l'AQR, nous retiendrons cette estimation du niveau de contamination moyen des m \acute{e} l \acute{e} es fran \acute{c} aises dans le cadre de l'estimation du nombre de cas sporadiques de SHU li \acute{e} s \acute{a} la consommation de steaks hach \acute{e} s surgel \acute{e} s en foyer.

3.2 Estimation du niveau de contamination lors de l' \acute{e} pid \acute{e} mie survenue en 2005

Lors de l' \acute{e} pid \acute{e} mie li \acute{e} e \acute{a} la consommation de steak hach \acute{e} en 2005, 22 \acute{e} chantillons pr \acute{e} lev \acute{e} s de la m \acute{e} l \acute{e} e incrimin \acute{e} e ont fait l'objet d'une recherche du pathog \acute{e} ne et d'un d \acute{e} nombrement sur milieux g \acute{e} los \acute{e} s s \acute{e} lectifs. Les 22 \acute{e} chantillons \acute{e} taient tous positifs. Lors du d \acute{e} nombrement une dilution au dixi \acute{e} me est effectu \acute{e} e (les 25 g sont m \acute{e} lang \acute{e} s \acute{a} 225 g de bouillon) et un millilitre de la suspension est \acute{e} tal \acute{e} sur trois bo \acute{i} tes de Petri. Le nombre de colonies de O157 :H7 observ \acute{e} es sur l'ensemble des 3 bo \acute{i} tes peut donc \acute{e} tre exprim \acute{e} en nombre de bact \acute{e} ries pr \acute{e} sentes dans 0,1 g de viande hach \acute{e} e. Sur ces 22 \acute{e} chantillons, 12 n'ont donn \acute{e} aucune colonie, 7 ont donn \acute{e} 1 colonie et 3 ont donn \acute{e} 2 colonies. On a donc, en moyenne, obtenu 0,59 bact \acute{e} ries par 0,1 g.

Par la m \acute{e} thode des moments et en supposant que la r \acute{e} partition des pathog \acute{e} nes dans cette m \acute{e} l \acute{e} e suit une loi de Poisson, on peut donc facilement estimer la concentration moyenne au sein de cette m \acute{e} l \acute{e} e \acute{a} 5,9 ufc.g $^{-1}$. La loi de Poisson ainsi ajust \acute{e} e a \acute{e} t \acute{e} repr \acute{e} sent \acute{e} e avec les donn \acute{e} es sur la figure suivante. Cette figure montre que la loi de Poisson s'ajuste bien aux donn \acute{e} es observ \acute{e} es sur cette m \acute{e} l \acute{e} e contamin \acute{e} e. Par ailleurs la statistique du χ^2 calcul \acute{e} e sur ces donn \acute{e} es ne montre pas de diff \acute{e} rence significative entre la distribution observ \acute{e} e et une loi de Poisson ($\chi^2 = 0,26$, $p = 0,61$) ce qui conforte le choix de cette loi pour d \acute{e} crire la distribution des bact \acute{e} ries dans une m \acute{e} l \acute{e} e contamin \acute{e} e associ \acute{e} e \acute{a} une \acute{e} pid \acute{e} mie.

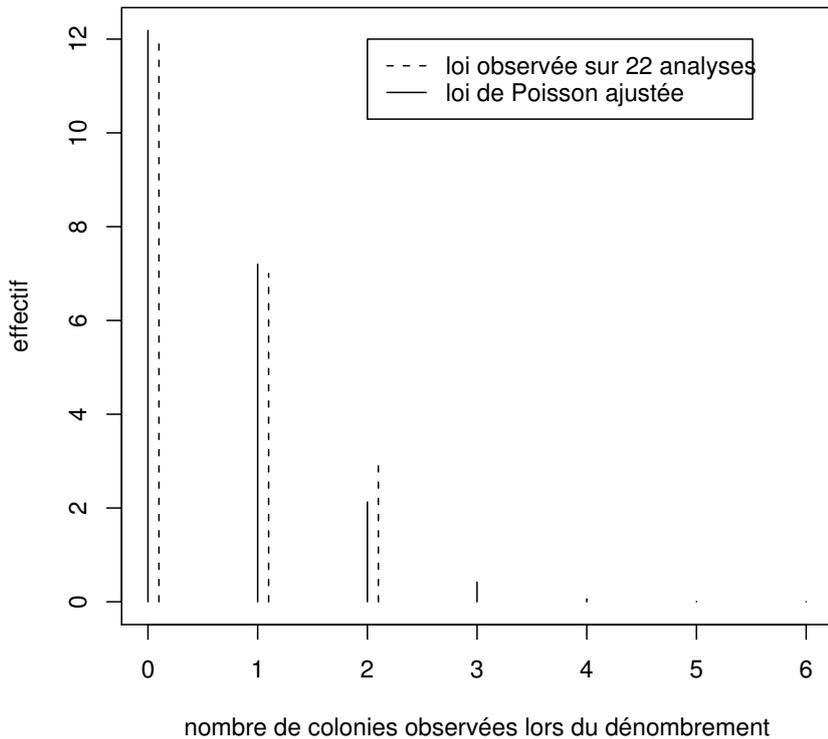


Figure 2 : Distribution observée du nombre de colonies

Diagramme en bâtons de la distribution observée sur les 22 échantillons analysés des résultats de dénombrement sur boîte de Petri (traits pointillés) et de la loi de Poisson ajustée sur ces données (traits pleins).

Par ailleurs une approche bayésienne a été envisagée afin de quantifier l’incertitude sur l’estimation du paramètre de cette loi de Poisson, c’est-à-dire du niveau moyen de contamination de la mèche incriminée. Le logiciel BRugs a à nouveau été utilisé en prenant comme distribution *a priori* sur la moyenne de la loi de Poisson exprimée en $\log_{10}[ufc.g^{-1}]$ la loi peu informative $N(0;1,5)$. L’inférence bayésienne a été réalisée en modélisant simultanément les données de détection (22 analyses positives sur 22) et les données de dénombrements sur les 22 échantillons afin de tenir compte de toute l’information disponible sur les 22 échantillons analysés. Cette inférence a permis de quantifier un intervalle de crédibilité à 95% sur la concentration moyenne en *E. coli* O157:H7 dans la mèche incriminée de $[3,0 ;9,0]$. Nous pouvons donc considérer que nous avons une estimation relativement précise du niveau de contamination de cette mèche.

4- Conclusions

Le très faible niveau de contamination de la viande hachée par *E. coli* O157:H7 pourrait expliquer la survenue de cas sporadiques. A l’opposé, une contamination accidentelle et à un niveau élevé de la viande hachée pourrait entraîner une épidémie.

Module n° 3 : Consommation

1- Données de consommation utilisées

Les données de consommations utilisées ont été extraites des quatre sources décrites ci-dessous :

1.1. Enquête Bébés-Sofres/SFAE (2005):

L'enquête Bébés⁵ a été réalisée au premier trimestre de 2005, par la Sofres et le CHU de Dijon pour le compte du Syndicat Français des Aliments de l'Enfance. L'échantillon étudié est constitué de 706 enfants âgés de 1 à 36 mois et est représentatif des familles françaises métropolitaines ayant des enfants de même âge en termes de région, taille de commune et catégorie socio-professionnelle du chef de ménage. Les parents de l'enfant étudié, ont noté durant trois jours consécutifs toutes les prises alimentaires de leur enfant.

De cette enquête, seule la consommation de steaks hachés a été retenue.

1.2. Enquête INCA2 (CREDOC-Afssa-DGAL, 2006-07) :

L'enquête « Individuelle et Nationale de Consommation Alimentaire » a été menée sur le territoire français de décembre 2005 à mai 2007, intégrant ainsi les effets saisonniers. Elle a recueilli toutes les prises alimentaires renseignées par les 4079 individus, enfants et adultes, représentatifs de la population française sur une période de 7 jours consécutifs. La représentativité nationale a été assurée par un tirage au sort à 3 degrés (unité primaire géographique, logement puis individu) dans le fichier du recensement national de 1999. L'échantillon inclut tous les individus.

Dans cette enquête, nous avons tenu compte de la consommation de steaks hachés, de hamburgers et cheeseburgers. Pour ces deux derniers, un coefficient multiplicatif a été appliqué à la quantité totale consommée afin d'estimer la quantité réelle de steak haché dans le produit (respectivement 50% et 30% de steak haché dans le hamburger et le cheeseburger).

1.3. Effectif INSEE (2007) :

Les chiffres INSEE correspondant au recensement de la population française ont été recueillis sur le site de l'INSEE (www.insee.fr).

1.4. Panel SECODIP (année 2004)

Il ne s'agit pas d'une enquête alimentaire individuelle mais ce panel présente un relevé des achats des ménages, par scanning informatique, tout au long de l'année et sur une période minimale de 36 semaines par an. Ces relevés ne permettent donc pas d'estimer les consommations par groupe de population spécifique, et le calcul par individu est imprécis puisqu'il s'agit de la quantité achetée par le ménage divisé par le nombre d'individus dans le foyer. On fait donc l'hypothèse que la consommation est équitable entre tous les individus du ménage (pas de distinction adultes/enfants).

⁵ « Consommation alimentaire des nourrissons et enfants français en bas âge (âgés de 1 à 36 mois) - Analyse des données nutritionnelles » Etude TNS-SOFRES 2005 / Université de Bourgogne - Pr M. FANTINO pour le Syndicat Français des Aliments de l'Enfance.

Les données SECODIP étant des données d'achats, elles ne tiennent pas compte de la restauration hors foyer (telle que la restauration collective), de l'autoconsommation⁶ ou de ce qui n'est pas consommé (restes dans l'assiette).

Ces données ont permis de calculer la part d'achat de steaks hachés surgelés dans les ménages français. Ce pourcentage est de 42 % des steaks hachés achetés par les ménages. En effet, les particuliers privilégient la viande réfrigérée par rapport à la viande surgelée, cette dernière étant essentiellement consommée en collectivité.

2- Estimation de la consommation de steaks hachés dans la population française

2.1. Portions ingérées :

Le tableau 1 présente la distribution des portions ingérées par prise alimentaire pour chaque classe d'âge d'enfants (INCA2 et Bébés 2005).

Pour près de 40% des enfants de moins de 5 ans, la portion de steak haché consommée est comprise entre 50 et 100 g mais elle ne dépasse pas 150 g pour cette même classe d'âge. Par ailleurs, près de la moitié de la population des enfants de 5 à 10 ans consomme des portions allant de 100 à 150 g, l'autre moitié consommant principalement des portions inférieures. Enfin, pour les enfants âgés de 10 à 16 ans, la portion majoritairement ingérée est la même que pour la classe d'âge précédente (entre 100 et 150 g), on note quand même que près de 15% de cette population consomme des portions de steak haché supérieures à 150g.

Tableau 1 : Distribution des portions ingérées pour chaque classe d'âge.

Paramètre <i>portion</i> (g)]0 - 50]]50 - 100]]100 -150]]150 - 200]]200 – 250]]250 – 300]]300 – 350]]350 – 400]
Classe d'âge								
[0 - 5 ans[54,1%	39,5%	6,4%	0%	0%	0%	0%	0%
[5 – 10 ans[15,6%	35,9%	45,5%	2,6%	0 %	0,4%	0%	0%
[10 – 16 ans[6,7%	24,9%	52,9%	12,2%	2,7%	0,3%	0%	0,3%

2.2. Consommation de steaks hachés :

Les données recueillies auprès des sources décrites ci-dessus ont permis, à partir du nombre de prises de steaks hachés par personne et par classe d'âge, de définir, au regard de l'effectif de chaque classe d'âge, le nombre de prises au niveau de la population entière par an, puis de calculer la part de cette consommation représentée par les steaks hachés surgelés pour chaque classe d'âge (c'est à dire 42 % du total des steaks hachés) ainsi que de définir la part de la consommation par tranche d'âge. *A titre d'exemple, l'estimation de la consommation du nombre de steaks hachés chez les enfants de 0 à 5 ans est de 113,73 millions de steaks hachés par an (parmi lesquels 47,77 millions sont des steaks surgelés). Ainsi 7,40% des consommations de steaks hachés concernent les enfants de 0 à 5 ans.*

⁶ Consommation des produits de sa propre production.

Tableau 2 : Estimation de la consommation de steaks hachés dans la population française par classe d'âge.

	[0-5[ans ^{1,2}		[5-10[ans ²	[10-16[ans ²	+ de 16 ans ²
Nombre d'enfants interrogés	706	97	385	677	2920
Nombre total de jours enquêtés	2118	668	2650	4675	20176
Nombre de prises pendant la période d'enquête	156	62	271	401	1288
Nombre de prises alimentaires par personne/an	26,88	33,88	37,33	31,31	23,30
Effectifs INSEE au 1er Janvier 2006 (millions)	2,29	1,54	3,73	4,46	49,15
Estimation du nombre de prises alimentaires dans la population française par an (millions)	61,56	52,17	139,23	139,63	1145,24
	113,73				
Dont nombre de prises alimentaires de steaks surgelés dans la population française (hors restauration collective)*	47,77		58,48	58,65	481
Part de la consommation par tranche d'âge	7,40%		9,05%	9,08%	74,47%

Les chiffres en exposant font référence aux enquêtes de consommation citées ci-dessus ; 1 : enquête Bébés et 2 : enquête INCA2.

Pour faciliter la lecture, les chiffres figurant dans le tableau ci-dessous ont été arrondis à deux chiffres après la virgule.

*soit 42% de la consommation totale de steaks hachés (données SECODIP)

3-Conclusions :

Les résultats présentés ci-dessus seront exploitables pour la poursuite de la modélisation. Ils serviront donc de données pour l'appréciation quantitative du risque.

Module n°4 : Enquête sur les habitudes de cuisson des steaks hachés consommés par les enfants de moins de 16 ans

1- Contexte et objectif

Dans le cadre de l'évaluation du risque de syndrome hémorragique urémique (SHU) chez les enfants de moins de 16 ans lié à la consommation de steak haché insuffisamment cuit, les données sur les habitudes de cuisson des consommateurs étaient indispensables à la construction des modèles de microbiologie prévisionnelle.

Celles-ci n'étant pas disponibles, une enquête *ad hoc* a été réalisée dans un premier temps par les membres du groupe de travail auprès des crèches, écoles maternelles et primaires, collèges et lycées afin d'estimer les températures de cuisson des steaks hachés consommés par les enfants. Dans un second temps, la participation de plusieurs pédiatres a été requise afin de compléter les données sur les habitudes de cuisson des steaks hachés car les effectifs des tranches d'âge les plus jeunes (entre 0 et 6 ans) étaient insuffisants par rapport aux autres. Un nouveau recueil de données a donc été effectué auprès de parents venant consulter dans un cabinet médical.

Ces deux enquêtes ont eu lieu entre les mois de juin et septembre 2005.

2- Méthodologie

Un questionnaire portant sur la cuisson des steaks hachés consommés au domicile des enquêtés et au restaurant scolaire (pour les enfants de plus de 6 ans), a été élaboré par les membres du groupe de travail (*cf.* questionnaire en annexe I). Le questionnaire est organisé en 2 parties : un premier ensemble de questions concerne les caractéristiques socio-démographiques de la personne enquêtée (en veillant au respect du principe de l'anonymat). Il s'agit de l'âge, du sexe, du département de résidence et du lien de parenté avec l'enfant de la personne interrogée. La deuxième partie du questionnaire porte sur les habitudes de cuisson des steaks hachés. Les enfants de plus de 6 ans sont directement enquêtés après autorisation de la personne accompagnant l'enfant. Pour les enfants de moins de 6 ans, il est demandé aux personnes les accompagnant de bien vouloir répondre aux questions sous réserve que ces personnes aient connaissance des habitudes de préparation et de cuisson des steaks que l'enfant consomme.

Pour la seconde partie de l'étude (administration du questionnaire chez les pédiatres), une version simplifiée du questionnaire, comportant 4 questions, a été soumise aux parents d'enfants de moins de 6 ans. Les questions concernant la situation personnelle portent sur le département de résidence, le sexe de l'enfant ainsi que sa tranche d'âge (par tranche d'une année). La deuxième partie du questionnaire porte sur les habitudes de cuisson des steaks hachés. Les données recueillies ont été annexées aux données collectées lors de la 1^{ère} enquête et exploitées pour les habitudes de cuisson des steaks hachés consommés au domicile des enfants.

Afin de faciliter l'identification des températures par les enquêtés, une planche photo, avec 4 photographies de steaks hachés (cru, rouge, rosé et bien cuit) correspondant à différents niveaux de cuisson des steaks hachés, était proposée (*cf.* annexe 2).

3- Résultats

3.1. Caractéristiques socio-démographiques

Participation à l'enquête :

Au total, 589 questionnaires exploitables ont été remplis. Parmi les enquêtés, 14 (soit 2,4%) n'ont pas participé à l'enquête pour une des raisons suivantes : « ne consomme pas de viande », « ne consomme pas de steak haché » ou « ne consomme pas de steak haché industriel (hachage fait à la maison) ». La non-consommation de steak haché est le premier motif avancé (70% des réponses).

Répartition par classe d'âge :

Cette étude porte sur les individus de moins de 16 ans (6 personnes de plus de 16 ans enquêtées ont été exclues de l'analyse). L'effectif total est de 589 individus entre 0 et 15 ans révolus répartis en 3 classes d'âges. Les trois classes d'âges qui ont été choisies sont les enfants de [0 - 5 ans[, de [5 - 10 ans[et de [10 - 16 ans[. La répartition des réponses en fonction de la classe d'âge est respectivement de 25%, 43% et 31%.

Répartition par sexe :

Les filles représentent 49,7% des enquêtés et les garçons 48,4%.

Répartition par département de résidence :

L'enquête a eu lieu dans 16 départements français avec une répartition hétérogène entre les départements. Globalement, l'origine des enquêtés était majoritairement urbaine : les principales régions étant la région parisienne (66,5% des enquêtés), le centre de la France (13,1%) et l'agglomération lyonnaise (11,5%).

Tableau 3 : Caractéristiques socio-démographiques renseignées dans les questionnaires

	n	%
<u>Participation à l'enquête</u>	589	-
<u>Motifs de non-participation</u>		
-ne consomme pas de viande	3	21,4
-ne consomme pas de steak haché	10	71,4
-ne consomme pas de steak haché industriel (hachage maison)	1	7,1
Total	14	100,0
<u>Classes d'âge</u>		
[0 - 5 ans[149	25,3
[5 – 10 ans[253	43,0
[10 – 16 ans[181	30,7
Fréquence manquante	6	1,0
Total	589	100,0
<u>Répartition par sexe</u>		
Fille	293	49,7
Garçon	285	48,4
Fréquence manquante	11	1,9
Total	589	100,0
<u>Départements de résidence</u>		
Alpes-Maritimes (06)	8	1,4
Calvados (14)	4	0,7
Corrèze (19)	41	7,0
Haute-Garonne (31)	39	6,6
Puy-de-Dôme (63)	36	6,1
Rhône (69)	67	11,4
Paris (75)	21	3,6
Seine-et-Marne (77)	9	1,5
Yvelines (78)	25	4,2
Somme (80)	1	0,2
Vaucluse (84)	1	0,2
Essonne (91)	55	9,3
Hauts-de-Seine (92)	2	0,3
Seine-Saint-Denis (93)	3	0,5
Val-de-Marne (94)	256	43,5
Val-d'Oise (95)	20	3,4
Fréquence manquante	1	0,2
Total	589	100,0

3.2. Niveau de cuisson des steaks hachés

Répartition générale :

Une majorité d'enfants (49%) déclare consommer des steaks hachés rosés à la maison. Près du tiers les consomme bien cuits.

Tableau 4 : Niveaux de cuisson des steaks hachés consommés à la maison

	n	%
Participation à l'enquête	571	
Fréquence manquante	18	
Répartition générale		
Cru	4	0,7
Saignant	90	15,3
Rosé	289	49,1
Bien cuit	183	31,1
Ne sait pas	5	0,8
Fréquence manquante	18	3,1
Total	589	100,0

Répartition par classe d'âge :

L'analyse des données par tranche d'âge montre une différence dans les habitudes de consommation entre la classe d'âge la plus jeune (0-4 ans) et les autres classes d'âge.

En effet, près de 48% des parents d'enfants âgés de 0 à 4 ans déclarent préparer des steaks hachés bien cuits à leurs enfants. Ce résultat est rassurant car cette tranche d'âge est tout particulièrement sensible à différents agents pathogènes dont *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Dans les tranches d'âge supérieures, les enfants consomment leur steak haché moins cuit. Ainsi, à partir de l'âge de 5 ans, plus de la moitié des enfants interrogés déclare consommer du steak haché rosé, et seulement le quart le consommant bien cuit.

Tableau 5 : Niveaux de cuisson des steaks hachés consommés à la maison par classe d'âge

	n	%
Participation à l'enquête	571	
Fréquence manquante	18	
Répartition par classe d'âge		
[0 - 5 ans[
Cru	0	0,0
Saignant	14	9,4
Rosé	59	39,6
Bien cuit	71	47,7
Ne sait pas	0	0,0
Fréquence manquante	5	3,4
Total	149	100,0
[5 – 10 ans[
Cru	2	0,8
Saignant	40	15,8
Rosé	130	51,4
Bien cuit	69	27,3
Ne sait pas	3	1,2
Fréquence manquante	9	3,6
Total	253	100,0
[10 – 16 ans[
Cru	2	1,1
Saignant	35	19,3
Rosé	96	53,0
Bien cuit	43	23,8
Ne sait pas	2	1,1
Fréquence manquante	3	1,7
Total	181	100,0

4- Discussion

Cette enquête *ad hoc* a permis d'obtenir des informations satisfaisantes et exploitables sur les habitudes de cuisson et de consommation des steaks hachés chez les enfants de moins de 16 ans en France, données qui n'étaient pas disponibles dans la littérature française.

Le fait que l'enquête ait été menée par les membres du groupe et sur une période courte (juin-septembre 2005) implique des limites dans l'interprétation de ces résultats :

-Au niveau méthodologique, et au regard des contraintes de réalisation (besoin rapide de résultats, impossibilité de faire appel à des enquêteurs professionnels,...) aucun plan d'échantillonnage précis n'a été réalisé. Cependant, le questionnaire a été construit de façon à limiter les biais d'interrogation et des consignes minimales ont été données aux enquêteurs pour limiter les biais de réalisation (ne pas réaliser de questionnaire collectif, éviter de réaliser l'enquête auprès d'enfants de collègues, n'interviewer qu'un seul enfant par fratrie...).

-Le fait que les experts du groupe de travail aient réalisé l'enquête a deux conséquences majeures : D'une part, ils ne disposaient pas d'une formation adéquate pour mener de manière optimale l'enquête, et d'autre part, la répartition géographique de l'enquête n'est pas représentative de la

situation nationale car les écoles visitées appartenaient la plupart du temps aux départements de résidence des enquêteurs.

5- Conclusions

Cette enquête a permis d'obtenir des informations essentielles pour établir les modèles de microbiologie prévisionnelle nécessaires à l'analyse quantitative du risque, puisqu'elle a fourni des données (non disponibles dans la littérature) sur les habitudes de cuisson et de consommation des steaks hachés chez les enfants de moins de 16 ans en France.

Ainsi, ces résultats ont permis de montrer que près de 50% des enfants âgés de 0 à 5 ans consomment à la maison des steaks hachés bien cuits, ce qui va dans le bon sens par rapport au danger lié à *E. coli* O157:H7. A partir de l'âge de 5 ans, plus de la moitié des enfants interrogés déclarent consommer du steak haché rosé et un quart le consomme bien cuit.

Module n°5 : Destruction thermique

1- Etat de l'art

Les modèles de microbiologie prévisionnelle courants reposent sur (Afssa, 2003) :

- un modèle primaire décrivant la cinétique de survie au cours du temps à une température fixe, avec un paramètre D (temps de réduction décimale) ;
- et un modèle secondaire décrivant l'évolution de ce paramètre D en fonction de la température.

Ces modèles sont bien connus et paramétrés, y compris pour *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée de bœuf (Afssa, 2003). Il est ensuite aisé d'intégrer, au cours du temps, un modèle global décrivant la cinétique de survie à une température variable.

La difficulté est essentiellement de décrire la température du steak haché en tout point au cours de la cuisson. Des modélisations par éléments finis ont été proposées (Bellara *et al.*, 1999 ; Zorrilla et Singh, 2003), mais elles sont très lourdes à mettre en œuvre. Des applications de ces modélisations ont été proposées pour optimiser les méthodes de cuisson des steaks hachés sur double grille (Pan *et al.*, 2000 ; Zorrilla *et al.*, 2003 ; Ou et Mittal, 2006). Ces applications montrent qu'à certains moments de la cuisson, la destruction microbienne est "totale" (>20 réductions décimales ou RD) vers la surface du steak et nulle au centre de celui-ci. Ceci s'explique facilement. En effet, la destruction microbienne est "totale" au bout de quelques secondes si la température dépasse 65-70°C alors que le temps de réduction décimale est de l'ordre de quelques minutes à 60°C (Rocelle *et al.*, 1998 ; Murphy *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2004). Or le temps de cuisson au bout duquel la température dépasse ce seuil de 65-70°C est très variable suivant la localisation dans le steak haché.

Il apparaît donc difficile d'envisager l'utilisation de modèles simples pour décrire la destruction thermique des *E. coli* O157:H7 dans le steak haché dans le cadre d'une AQR. Dans les études canadiennes et américaines (Cassin *et al.*, 1998 ; FSIS-USDA, 2001), un modèle simple basé sur une étude expérimentale est utilisé. Ce modèle relie linéairement la température atteinte au cœur du steak haché en fin de cuisson au niveau microbien final (Juneja *et al.*, 1997). L'étude expérimentale à la base de ce modèle met en œuvre un mode de cuisson rapide en 2 à 4 minutes sur simple grille très chaude avec retournement toutes les 45 secondes. Ce mode de cuisson ne semble pas correspondre au mode de cuisson utilisé classiquement par les consommateurs français. En effet, les mesures de températures effectuées au cours d'une cuisson qui correspondrait aux pratiques familiales françaises c'est à dire d'un steak haché surgelé dans une poêle avec un seul retournement à mi-cuisson montrent que le temps nécessaire pour obtenir une température de 65-70°C dépasse 10 minutes.

De plus, des études ont montré que pour une même température atteinte à cœur en fin de cuisson, le mode de cuisson (simple ou double gril, fréquence des retournements en simple gril) avait un impact important sur le niveau de destruction microbienne obtenu (D'sa *et al.*, 2003 ; Rhee *et al.*, 2003). L'étude de Rhee *et al.* (2003) indique que, pour les 9 essais réalisés avec un mélange de 5 souches de *E. coli* O157:H7, pour une cuisson sur simple gril avec un seul retournement et une température à cœur de 73°C environ atteinte au bout de 9 à 12 minutes, le nombre moyen de RD est de 4,7. L'écart type est d'environ 1 RD (cf. fig. 3). L'étude de D'sa *et al.* (2003) rapporte, pour les 24 essais réalisés avec un mélange de 5 souches de *E. coli* O157:H7, pour le même type de cuisson avec 2 températures atteintes à cœur d'environ 63°C et 69°C, des nombres moyens de réductions décimales de 1,3 et 2 sont obtenus. L'écart type est d'environ 1 RD pour chacune des deux températures testées (cf. fig. 3). Soulignons que ces études avaient été réalisées avec des steaks hachés frais (non surgelés) et que la montée en température dans un steak haché surgelé non

décongelé est plus lente par rapport à un steak haché réfrigéré. Malheureusement aucune étude similaire n'a été publiée dans la littérature pour la cuisson des steaks surgelés.

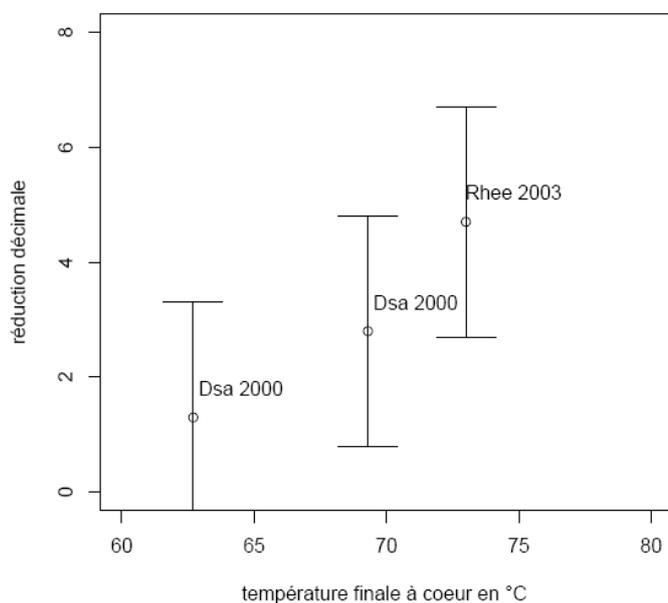


Figure 3: Moyennes et plages approximatives des nombres de réductions décimales *d'E. coli* O157:H7 reportés dans la littérature pour différentes températures à cœur dans des steaks hachés frais cuits sur simple grille avec un seul retournement en cours de cuisson

Dans l'étude hollandaise (RIVM, 2001), les auteurs considérant aussi que le modèle de Juneja n'était pas applicable, ont proposé de fixer le nombre de réductions décimales par « avis d'experts » à 2 RD pour le mode de cuisson « medium raw » et à 5 RD pour le mode de cuisson « well done », ce qui semble cohérent avec les données de D'sa *et al.* (2000) et de Rhee *et al.* (2003). Le fait qu'aucune incertitude ni variabilité n'ait été modélisée est en revanche surprenant.

Pour la situation française, nous avons considéré qu'aucune des études publiées ne portait sur le mode de préparation majoritairement mis en œuvre dans les foyers familiaux français : cuisson à la poêle (même si cela se rapproche vraisemblablement de la cuisson sur simple gril) et surtout une cuisson à partir de steaks hachés initialement surgelés. Nous avons donc choisi de conduire des expérimentations qui ont été réalisées par le LERQAP.

2- Expérimentations et modélisation retenue

2.1. Introduction :

Au vu du manque de données décrit ci-avant, un laboratoire de l'Afssa (le Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agro-alimentaires, Maisons-Alfort) a réalisé des essais expérimentaux de suivi de destruction d'*E. coli* O157:H7 au cours de la cuisson à la poêle de steaks hachés surgelés. Pour des raisons techniques mais également pour se rapprocher des données de l'enquête de consommation, il a été choisi d'exprimer la destruction obtenue, non pas en fonction de la courbe de température à cœur, mais directement en fonction de l'aspect visuel des steaks (en comparaison aux photos de référence présentées dans le module n°4).

2.2. Matériel et méthodes

Souche :

La souche de *E. coli* O157:H7 utilisée pour contaminer les steaks hachés, est une souche mutante (non entéro - hémorragique) provenant de l'ENV-Lyon. Cette souche est conservée sur gélose TSA en pente à 3°C.

Viande hachée :

De la viande hachée de bœuf, de fabrication industrielle, fraîche à 15% de matière grasse et conditionnée en barquette de 350g ou 650g est utilisée.

Inoculum :

Deux subcultures sont réalisées à 37°C en milieu TSB durant respectivement 24h et 17h afin d'obtenir une population bactérienne en phase stationnaire de croissance à une concentration d'environ 10⁹ ufc/mL.

Inoculation :

La viande hachée est mise dans un bol mixer, pesée, contaminée avec un volume d'inoculum permettant d'obtenir un niveau de contamination d'environ 10⁷ ufc/g et homogénéisée (rotation de la pale d'un robot mélangeur).

A partir de cette mûlée contaminée, des échantillons de 100g sont réalisés puis formés dans un moule à steak haché (une attention particulière est portée pour que chaque steak ait la même épaisseur).

Ces steaks hachés sont ensuite conditionnés individuellement dans des sacs pour broyage péristaltique et surgelés à -24°C jusqu'à utilisation.

Cuisson des steaks hachés :

La cuisson des steaks est effectuée sur une plaque électrique d'une puissance de 1 500 watts.

La méthode de cuisson a été standardisée afin d'appliquer à chaque steak une cuisson la plus reproductible possible. Pour ce faire, un préchauffage de la plaque (thermostat en position maximale) est réalisé jusqu'à ce que le voyant thermostatique se rallume une seconde fois. Une fois le préchauffage terminé, la température de la plaque électrique oscille autour d'une valeur médiane de 280°C, et la température du fond intérieur de la poêle autour d'une valeur médiane de 180°C.

La poêle contenant 7 ml d'huile est alors aussitôt déposée sur la plaque électrique. Après 2 minutes de chauffage (poêle + huile), le steak surgelé est déposé dans la poêle, retourné à mi-cuisson et sorti après la durée de cuisson définie.

Les durées de cuisson sont les suivantes : 4 min – 5 min – 6 min – 6 min30 – 7 min - 7min30 – 8 min 30 - 9 min30 et 10min30. Rappelons que la cuisson généralement conseillée au consommateur pour les steaks hachés surgelés est une cuisson sans décongélation préalable d'environ 3-4 minutes par face, après préchauffage de la poêle.

Chaque cuisson est reproduite deux fois avec un steak par cuisson.

Appréciation visuelle du niveau de cuisson (cf. annexe 2)

Un groupe de 7 personnes est constitué pour juger visuellement, à partir des photos de l'enquête sur les habitudes de consommation, (photo B = saignant, photo C = rosé, photo D = bien cuit) le niveau de cuisson atteint à chaque temps de cuisson.

Après la cuisson, le steak haché est coupé en deux. Chaque personne dispose, pour réaliser cette appréciation, des photos de l'enquête et note le steak selon 3 critères : la couleur de la viande à cœur, le dessèchement de la viande au centre et l'épaisseur du brunissement.

Pour chaque steak, 3x7 = 21 jugements (attribution à une photo) sont donc obtenus et exprimés sous la forme de pourcentage d'appartenance à chaque classe de cuisson.

Refroidissement rapide après cuisson

Sitôt l'appréciation visuelle réalisée, le steak est entreposé pendant environ 30 minutes dans un congélateur à -18°C pour assurer une descente rapide en température. Il est ensuite transféré dans une enceinte à 3°C en attendant d'être analysé.

Dénombrement de *E. coli* O157:H7

Chaque steak est remis en suspension en eau peptonée tamponnée (dilution au demi), puis homogénéisé à l'aide d'un broyeur péristaltique. Une étape de revivification de 45 min à température ambiante est réalisée avant le dénombrement.

La suspension mère ou ses dilutions décimales successives sont dénombrées en inoculant 0,1 mL à la surface de boîtes de gélose SMAC (Mac Conkey + Sorbitol).

Après 24h d'incubation à 37°C , les colonies typiques de *E. coli* O157:H7 sont dénombrées.

Un test de confirmation au latex est réalisé sur 5 colonies prises au hasard sur chaque boîte retenue pour confirmer leur appartenance au sérotype O157.

2.3. Résultats

Caractéristiques de la viande hachée

La qualité microbiologique de la viande hachée est évaluée sur 3 échantillons de 10g prélevés sur la mûlée de viande hachée avant contamination artificielle. Sa contamination en flore aérobie à 30°C est de $\text{Log}_{10}(\text{ufc/g})^{\circ} = 4,05 \pm 0,15$ (tous les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± 1 écart-type).

Le pH moyen de la viande hachée est de $5,79 \pm 0,007$ (moyenne effectuée sur 2 échantillons d'environ 15g de viande hachée) et son taux de matière grasse de 15%.

Contamination des steaks hachés par *E. coli* O157:H7

La concentration de la suspension bactérienne de *E. coli* O157:H7, ayant servi à contaminer les steaks hachés est de $\text{Log}_{10}(\text{ufc/g}) = 9,26$ et le niveau de contamination théorique des steaks hachés est donc de $\text{Log}_{10}(\text{ufc/g}) = 7,26$.

La contamination moyenne en *E. coli* O157:H7 des steaks hachés après congélation est de $\text{Log}_{10}(\text{ufc/g}) = 7,25 \pm 0,08$ (moyenne réalisée sur 7 échantillons de 50g de steak haché), ce qui est bien cohérent avec la concentration théorique et conforte l'hypothèse d'absence d'action de la congélation sur le niveau de contamination.

Présentation des résultats de l'appréciation visuelle en fonction de la durée de la cuisson

Le tableau 3 ci-après présente les résultats expérimentaux : pourcentage d'attribution à chaque photo (classe de cuisson) et dénombrement final d'*E. coli* O157:H7, et donc calcul du nombre de RD. De plus, les nombres de RD sont également convertis en deux expressions alternatives : facteur de destruction (*i.e.* facteur par lequel le nombre de bactéries est divisé), et pourcentage de destruction (*i.e.* pourcentage de bactéries ne survivant pas à la cuisson).

En ce qui concerne l'appréciation visuelle, on retiendra que les jugements ne sont pas unanimes (sauf pour 4 steaks bien cuits), ce qui traduit la difficulté d'interprétation des résultats de notre enquête de consommation, en particulier entre les photos B et C.

On note aussi que le second steak cuit pendant 7 minutes 30 se distingue des autres steaks cuits 7 minutes ou 7 minutes 30 : attribution à la photo B (saignant) et nombre de RD inférieure. Le profil de température enregistré au niveau de la plaque électrique au cours de cette cuisson est différent du précédent et explique cette anomalie de cuisson.

Tableau 6 : Résultats de l'appréciation visuelle et de la destruction microbienne pour chaque cuisson (2 steaks pour chaque durée). Photo B : saignant. Photo C : rosé. Photo D : à point. La destruction est exprimée par 3 paramètres équivalents (RD : nombre de destruction décimales ou différence entre la contamination après et avant cuisson ; facteur de destruction : facteur par lequel le nombre de bactéries est divisé, pourcentage de destruction : pourcentage de bactéries ne survivant pas).

Durée de la cuisson (en minute)	Appréciation visuelle globale (% de vote) En gras : majoritaire	Contamination après cuisson (Log ufc/g)	Destruction		
			RD	Facteur	Pourcentage
4 minutes	photo B (95%), photo C (5%)	7,11	0,14	1,4	28%
	photo B (78%), photo C (22%)	7,04	0,21	1,6	38%
5 minutes	photo B (76%), photo C (24%)	6,89	0,36	2,3	56%
	photo B (95%), photo C (5%)	7,04	0,21	1,6	38%
6 minutes	photo B (91%), photo C (9%)	6,62	0,63	4	77%
	photo B (86%), photo C (14%)	6,78	0,47	3	66%
6 minutes 30	photo B (66%), photo C (34%)	6,50	0,75	6	82%
	photo B (71%), photo C (29%)	6,69	0,56	4	72%
7 minutes	photo C (62%), photo B (38%)	6,53	0,72	5	81%
	photo C (66%), photo B (34%)	6,36	0,89	8	87%
7 minutes 30	photo C (89%), photo B (11%)	6,32	0,93	9	88%
	photo B (76%), photo C (24%)	6,57	0,68	5	79%
8 minutes 30	photo C (81%), photo D (19%)	6,08	1,17	15	93%
	photo C (100%)	6,30	0,95	9	89%
9 minutes 30	photo D (100%)	5,74	1,51	32	97%
	photo D (57%), photo C (43%)	5,92	1,33	21	95%
10 minutes 30	photo D (100%)	4,41	2,84	692	99,86%
	photo D (100%)	5,08	2,17	148	99,3%

Les nombres de réductions décimales (RD) sont ensuite représentés en fonction du degré de cuisson à la figure 4.

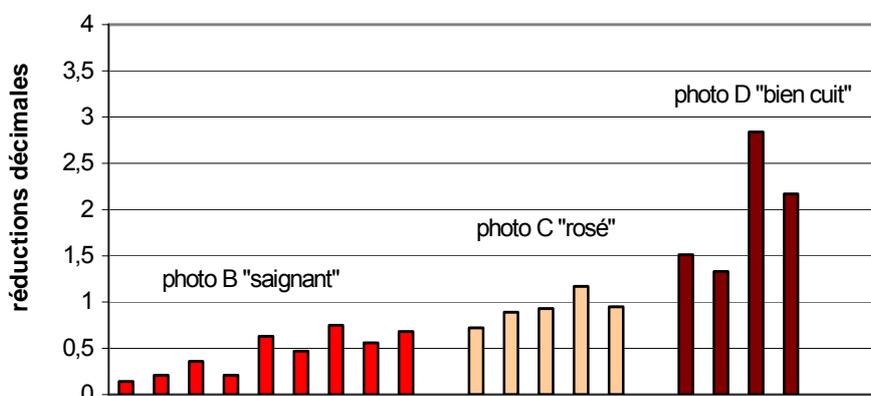


Figure 4 : Destruction de *E. coli* O157:H7 en fonction du niveau de cuisson (appréciation visuelle majoritaire)

2.4. Modélisation retenue

Sur la base de ces résultats, nous proposons une distribution uniforme des nombres de réductions décimales (RD) pour chaque classe de cuisson (B = saignant, C = rosé, D = bien cuit). Cette loi est centrée sur la moyenne des nombres de RD de chaque steak ayant été classé 1 ou plusieurs fois dans la classe pondérée par le nombre de votes l'affectant à cette classe (de 1 à 21). L'étendue de la distribution uniforme est telle que tous les nombres de RD de steaks de la classe y sont inclus. Ces résultats sont synthétisés dans le tableau 4.

Tableau 7 : Bilan par type de cuisson

Cuisson	Résultats expérimentaux				Modélisation retenue
	Appréciation visuelle majoritaire		Toutes appréciations visuelles		Loi de RD
	Moyenne des RD	[Min ; Max]	Moyenne pondérée des RD	[Min ; Max]	
Photo A (cru)	nd	nd	nd	nd	0
Photo B (saignant)	0,4	[0,1 ; 0,8]	0,5	[0,1 ; 0,9]	uniforme [0-0,9]
Photo C (rosé)	0,9	[0,7 ; 1,2]	0,7	[0,1 ; 1,3]	uniforme [0,2-1,4]
Photo D (bien cuit)	2,0	[1,3 ; 2,8]	1,8	[1,2 ; 2,8]	uniforme [1,2-2,8]

3- Discussion

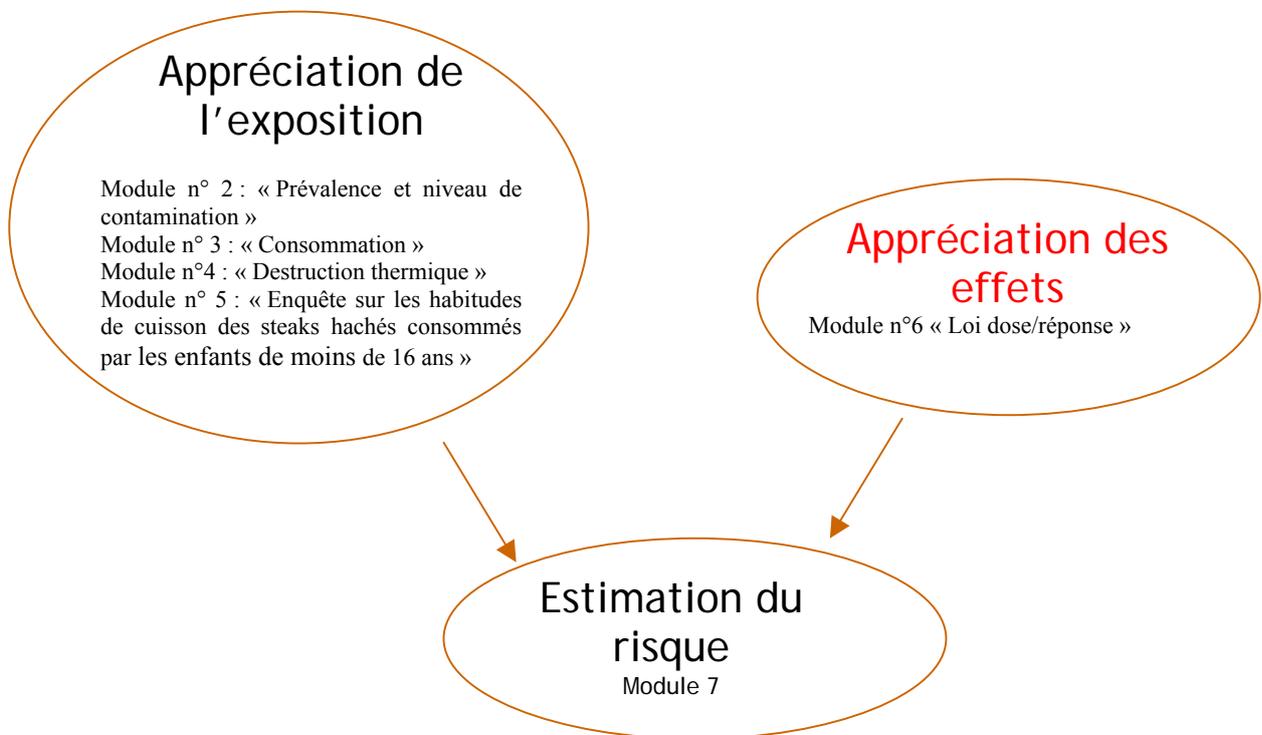
Les nombres de réductions décimales observées dans nos expérimentations sont inférieurs à ceux décrits dans la littérature. Ceci s'explique essentiellement par le fait qu'un seul retournement à mi-cuisson a été effectué. Néanmoins, même par rapport aux essais avec un seul retournement sur steaks hachés initialement frais (cf. Figure 1), ils restent faibles. Ainsi, une division de la population par 1000 (soit 99,9% de destruction ou RD = 3) n'est jamais atteinte dans les essais tandis qu'une telle destruction est proche des données de D'sa *et al.* (2000) et inférieure aux données de Rhee *et al.* (2003) (cf. Figure 1). Ceci peut s'expliquer par la différence de montées en température de produits initialement frais par rapport aux produits initialement surgelés, mais nécessiterait néanmoins d'être confirmé et étayé par d'autres observations. En effet, les observations sont très dépendantes des choix expérimentaux réalisés (thermostat de la plaque électrique, durées de cuisson retenues, etc.).

En ce qui concerne la durée de cuisson, des cuissons inférieures à 4 minutes ont été jugées insuffisantes, et assimilables au cas du steak cru, soit aucune destruction thermique. Des cuissons supérieures à 10 minutes 30 ont été jugées non réalistes, d'après l'apparence extérieure des steaks (selon les modalités de cuisson choisies).

4- Conclusions

Les données recueillies expérimentalement ont permis de pallier le manque d'informations et la non-pertinence des données de la littérature par rapport aux pratiques des foyers français. Elles sont utilisées pour la prévision de la destruction thermique d' *E. coli* O157:H7 dans les simulations réalisées ci-après car sont proches des pratiques de cuisson des ménages français.

Chapitre II : Appréciation des effets



Module n°6 : Loi dose/réponse

1- Introduction

1.1. Appréciation des effets⁷

En AQR, l'appréciation de l'exposition, détaillée dans les parties précédentes, est complémentaire d'une autre étape : l'appréciation des effets (parfois aussi dénommée "appréciation des conséquences" ou "caractérisation du danger"), qui concerne l'évaluation quantitative de la nature des effets néfastes sur la santé associés aux micro-organismes qui peuvent être présents dans les aliments.

Les effets sanitaires pour un individu donné peuvent être abordés globalement de deux façons différentes dans les AQR. La première, la plus couramment rencontrée dans les différentes publications d'AQR, va consister en l'estimation de trois probabilités conditionnelles, à savoir le risque d'infection⁸, de maladie et de décès. On considère un seul type de maladie, associé à un tableau clinique particulier, l'approche est linéaire. Cette approche est illustrée par la figure 5.

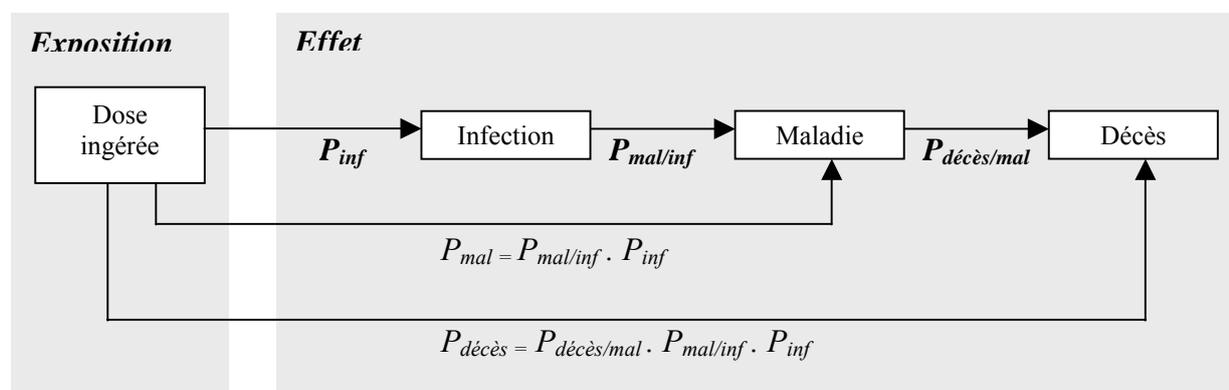


Figure 5 : Schéma des différents modules pour l'appréciation des effets (d'après Canivet, 2005; Haas, Rose, Gerba, 1999b)

La deuxième approche peut concerner différents types d'expression clinique pour un même agent microbien, l'effet sanitaire peut, dans ce cas être exprimé de différentes manières, par des indicateurs pertinents (Figure 6). Les blocs correspondants aux symptômes peuvent aussi être traduits sous la forme d'autres indicateurs sanitaires, comme les DALY⁹. On peut ainsi définir différents résultats sanitaires possibles pour un même agent infectieux. Ce type d'approche est notamment utilisé actuellement par l'OMS pour prioriser les agents infectieux dans le domaine de l'eau de distribution (OMS, 2003).

⁷ Paragraphe adapté du document du groupe de travail Afssa « Virus transmissibles à l'homme par voie orale », Question 8 (Quels sont les résultats de l'analyse des publications dans le domaine de l'Appréciation Quantitative des risques alimentaires liés aux virus ?). Rédaction : Mme Thébault, Mme De Valk.

⁸ Dans ce texte, le terme « infection » désigne la présence persistante d'un microorganisme dans un tissu, ce microorganisme étant capable de se multiplier et d'induire des lésions (avec ou sans manifestations cliniques). Le terme « maladie » correspond à l'apparition de signes cliniques, de symptômes.

⁹ DALY (Disability Adjusted Life Years) ou « années de vie corrigées de l'incapacité ». Permet l'estimation du coût sanitaire, par la mesure de la gravité d'une maladie qui tient compte du temps « d'invalidité » (temps où la qualité de vie ou la vie elle-même est restreinte du fait de la maladie). L'idée générale est d'accorder un poids à une maladie en fonction de sa sévérité (S) puis de multiplier ce poids par sa durée (D) et par le nombre de personnes potentiellement affectée par ce type de maladie (N). La mortalité a le maximum de poids en terme de sévérité, et sa durée est traduite en terme de perte d'espérance de vie.

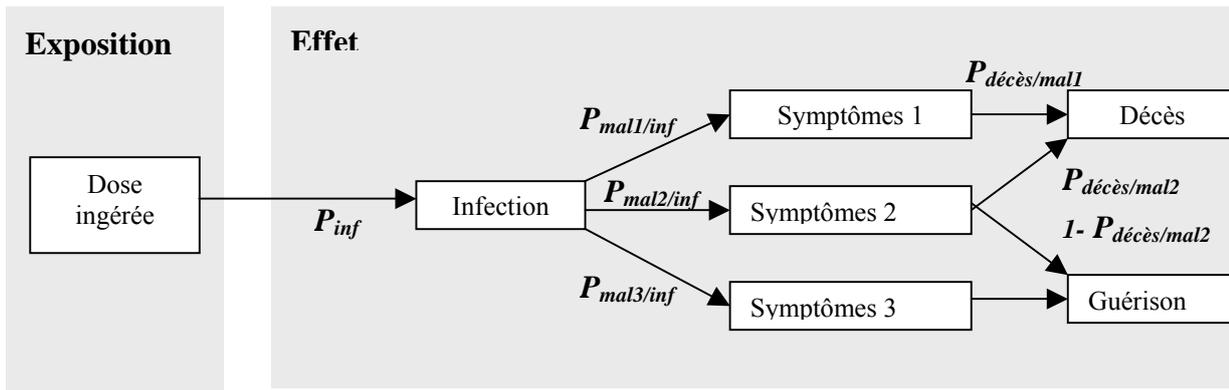


Figure 6 : Schéma de différents modules pour l'appréciation des conséquences d'un même agent infectieux (d'après Pruss et Havelaar, 2001)

Dans cette approche, la probabilité de décès sera de la forme :

$$P_{\text{décès}} = P_{\text{décès/mal 1}} \cdot P_{\text{mal 1/inf}} \cdot P_{\text{inf}} + P_{\text{décès/mal 2}} \cdot P_{\text{mal 2/inf}} \cdot P_{\text{inf}}$$

Enfin, d'autres approches peuvent être utiles pour estimer des effets sanitaires, en ne s'intéressant plus à l'individu mais à une population, et à des possibilités de transmission inter-humaine (Eisenberg *et al.*, 2004).

Dans le cas d'*E. coli* O157:H7, chez l'enfant de moins de 16 ans, l'approche utilisée pour évaluer les effets sanitaires pourrait être celle illustrée dans la Figure 7. Dans la figure comme dans la suite du texte, le SHU est considéré comme une complication de la maladie.

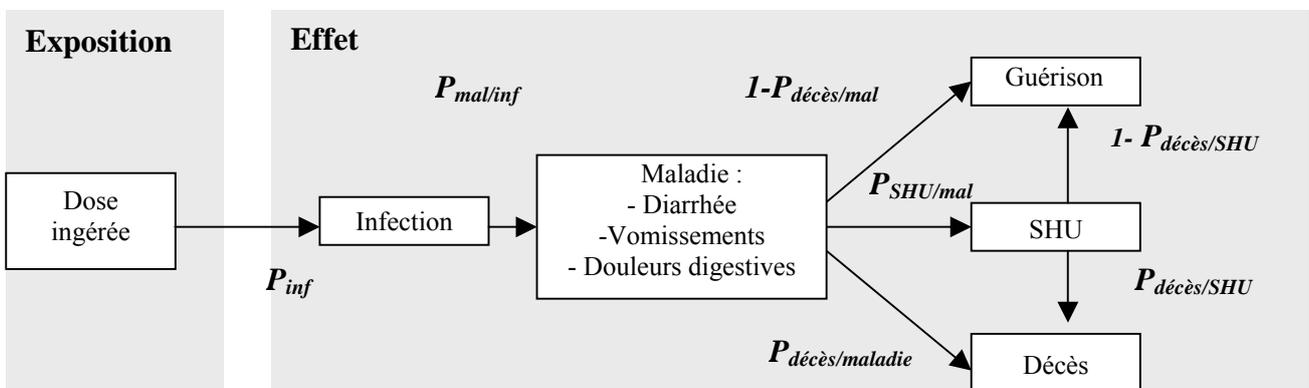


Figure 7 : Schéma simplifié des différents modules pour l'appréciation des effets de l'ingestion d'*E. coli* O157:H7 chez l'enfant de moins de 15 ans

En France, nous ne disposons pas à l'heure actuelle de données sur l'infection, ni sur les différents symptômes liés à une infection à *E. coli* O157:H7 (diarrhée, sanglante ou non, vomissements ou douleurs abdominales) ; il n'est donc pas possible de travailler sur la probabilité ou le risque de maladie sachant infection $P_{\text{mal/inf}}$. Une des complications principalement observées lors de l'évolution de la maladie est le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Actuellement, les seules données disponibles en France sur les infections à *E. coli* O157 reposent sur le système de surveillance du SHU chez l'enfant de moins de 15 ans (Espié *et al.*, 2006). Ainsi dans la suite de notre travail, nous nous sommes intéressés principalement à $P_{\text{SHU/maladie}}$ et $P_{\text{décès/SHU}}$.

1.2. Relation Dose Réponse

L'objectif d'une relation dose-réponse est d'établir un lien entre le niveau d'une exposition microbienne (dose ingérée de microorganismes) et la probabilité de survenue d'une conséquence (effet sanitaire) (Haas *et al.*, 1999). La conséquence retenue peut être soit l'infection, soit l'apparition de symptômes.

Dans le 1^{er} cas, la relation dose-réponse porte alors sur l'expression de P_{inf} en fonction de la dose, et il est d'usage (par défaut) de supposer que $P_{\text{mal/inf}}$ et $P_{\text{décès/mal}}$ sont indépendantes de la dose. Ce concept a été mis en doute dans la littérature : pour Teunis *et al.* (1999), la probabilité de maladie pourrait dépendre de la dose d'une façon différente de celle de la probabilité d'infection. Dans le cas de *Campylobacter*, par exemple, la probabilité d'infection augmente lorsque la dose augmente alors que la probabilité de maladie diminuerait à des doses très élevées (cité par Teunis *et al.*, 1999). Dans le cas d'*E. coli* O157:H7 nous disposons de très peu d'informations concernant la probabilité d'infection, mais des données sont disponibles concernant la probabilité de maladie en fonction de la dose (cf. paragraphes II et III). De plus, on constate que la probabilité de développer un SHU varie de façon considérable selon qu'il s'agit de cas sporadiques ou d'épidémies (cf. paragraphe V). En dehors de biais liés un manque d'exhaustivité des données, plusieurs facteurs pourraient permettre d'expliquer ce phénomène : (i) la virulence de la souche (une souche plus virulente serait plus susceptible d'être impliquée dans une épidémie et pourrait engendrer une probabilité plus élevée de développer un SHU) (ii) la dose (plus la dose augmente, plus le risque d'épidémie est important et plus le risque de développer un SHU serait élevé, ce qui paraît très vraisemblable). Dans le cas d'*E. coli* O157:H7, nous avons donc fortement remis en cause l'hypothèse selon laquelle $P_{\text{SHU/mal}}$ serait indépendante de la dose, sans avoir pu néanmoins étayer cette position, ni proposer d'alternative par manque de données chiffrées.

Dans le 2^{ème} cas, la relation dose-réponse porte sur l'expression de $P_{\text{mal}} = P_{\text{mal/inf}} \cdot P_{\text{inf}}$ en fonction de la dose et, de même, il est d'usage de supposer que $P_{\text{décès/mal}}$ est indépendante de la dose. Des exemples de ces 2 approches sont recensés par Canivet (2005).

Les relations dose-réponse sont déterminées à partir d'essais sur volontaires sains, d'expérimentations animales et peuvent être confirmées ou complétées par des études épidémiologiques. En l'absence d'une relation dose-réponse connue, il est possible de recourir à des avis d'experts pour analyser les divers facteurs nécessaires à l'appréciation des effets.

Dans les parties qui suivent, une synthèse des données bibliographiques nécessaires à l'établissement d'une relation dose-réponse pour *E. coli* O157:H7 a été réalisée : sont abordés successivement les points concernant les données provenant d'expériences dose-réponse chez l'homme ou l'animal (partie II), les données provenant d'épidémies (partie III), les modèles mathématiques utilisés (partie IV). Les données épidémiologiques concernant les proportions de SHU parmi les infections à *E. coli* O157 et de décès parmi les SHU sont ensuite présentées dans la partie V. L'analyse critique des données bibliographiques, couplée aux données nouvelles obtenues grâce à l'épidémie française survenue en octobre 2005, nous a permis de retenir les modèles les plus pertinents pour la construction d'une loi dose-réponse cohérente avec la situation observée en France.

2- Données provenant d'infections expérimentales

Les données relatives à des expérimentations humaines (sur volontaires sains) et animales (modèle lapin) qui ont déjà été utilisées pour la construction de relations dose-réponse sont présentées ci-après et dans le tableau 8.

1.1. *Shigella* / volontaires sains

Trois études publiées entre 1969 et 1973 ont consisté à faire ingérer à des prisonniers américains volontaires sains des doses connues de *Shigella flexneri* (DuPont *et al.* 1969- DuPont *et al.* 1972)

et de *Shigella dysenteriae* (Levine *et al.* 1973). Les détails expérimentaux sont rassemblés dans le tableau 8.

Sur le plan taxonomique, biochimique et génétique, les *Shigella* sont très proches d'*Escherichia coli* et appartiennent à un même groupe génomique. D'autre part, les toxines Stx1 et Stx2 de *E. coli* O157:H7 présentent une très forte homologie avec la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae*. Les données obtenues avec *Shigella* sur volontaires sains sont donc *a priori* pertinentes à titre de comparaison pour étudier la virulence d'*E. coli* O157:H7. Elles ont d'ailleurs été utilisées pour l'élaboration de nombreux modèles dose-réponse (cf. partie IV).

Nous avons retenu uniquement les données concernant le nombre de malades. Les données d'infection de Dupont 1972 n'ont pas été retenues (résultat aberrant : nombre de malades supérieur au nombre d'infectés).

1.2. *E. coli* entéropathogènes (EPEC) / volontaires sains

Les études de Levine *et al.* (1978) et Bieber *et al.* (1998) sont probablement les seules études cliniques réalisées sur des êtres humains avec des souches d'*Escherichia coli* pathogènes (Afssa, 2003). Il s'agit de souches d'*E. coli* entéropathogènes (EPEC) de divers sérotypes (cf. détails expérimentaux dans tableau 1). Ces données ont été utilisées par certains à titre de comparaison par rapport aux STEC. Ceci est justifié par la présence dans les deux pathotypes (EPEC et STEC O157:H7) des mêmes déterminants génétiques (locus d'effacement des entérocytes LEE, gène *eae*) impliqués dans d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, via des lésions d'attachement effacement (A/E).

1.3. *E. coli* O157:H7 / lapins

Pai *et al.* (1986) ont inoculé à des lapins âgés de 3 jours une souche fortement productrice de Shiga-toxines d'*E. coli* O157:H7. Une diarrhée ne se développe systématiquement qu'avec 1.10^8 *E. coli*. Pour la souche faiblement productrice de Shiga-toxines, les diarrhées ne sont observées que de façon irrégulière même avec un nombre d'*E. coli* plus élevé. Lors de ces essais, *E. coli* O157:H7 est retrouvé en plus grande concentration dans le colon que dans l'intestin grêle et les symptômes cliniques sont corrélés avec la présence de Shiga-toxines libres dans le colon.

Il est à noter que des infections expérimentales ont été réalisées sur d'autres modèles animaux (bovins, rats, souris) mais les données obtenues avec ces modèles n'ont pas été utilisées pour la construction d'une loi dose-réponse ; d'autre part, aucun modèle animal n'est actuellement transposable à l'homme (Afssa, 2003).

Tableau 8 : Bilan des données expérimentales (volontaires sains et animaux) utilisées pour construire des lois dose-réponse. nd: non déterminé

Références	Espèce et souches	Sujets	Matrice	Critères de maladie	dose (ufc)	P _{inf} : nombre d'infectés / nombre d'exposés	P _{mal} : nombre de malades / nombre d'exposés		
Levine <i>et al.</i> 1973, cité par Powell <i>et al.</i> , 2000 et par FSIS, 2001	<i>Shigella dysenteriae</i> , souche a1, isolée de cas humain	Prisonniers américains volontaires sains	Lait	Fièvre, diarrhée, dysenterie (sang et mucus dans les selles) ou vomissements	200	nd	1 / 4 = 25%		
					10000	nd	2 / 6 = 33%		
	10				nd	1 / 10 = 10%			
	200				nd	2 / 4 = 50%			
	2000				nd	7 / 10 = 70%			
DuPont <i>et al.</i> , 1969, cité par Strachan <i>et al.</i> , 2005	<i>Shigella flexneri</i> , souche 2457T isolée à partir d'un cas humain de shigellose	Prisonniers américains volontaires sans signes de diarrhée et sans expérience de shigellose, non vaccinés	Lait entier	Fièvre, crampes abdominales, diarrhée ou dysenterie (sang et mucus dans les selles)	10 ⁴	nd	1 / 4 = 25%		
					10 ⁵	nd	3 / 4 = 75%		
					10 ⁶	nd	7 / 8 = 88%		
					10 ⁷	nd	13 / 19 = 68%		
					10 ⁸	nd	7 / 8 = 88%		
DuPont <i>et al.</i> , 1972				Infection : détection du pathogène dans les selles Maladie : idem ci-dessus	180	6 / 36 = 17%	9 / 36 = 25%		
					5000	33 / 49 = 67%	28 / 49 = 57%		
					10 ⁴	66 / 88 = 75%	52 / 88 = 59%		
					10 ⁵	15 / 24 = 63%	14 / 24 = 58%		
Bieber <i>et al.</i> 1998, cité par Powell <i>et al.</i> , 2000 et par FSIS, 2001	EPEC B171-8, sérotype O111:NM	Volontaires adultes sains	nd	Diarrhée	5.0x10 ⁸	nd	3 / 5 = 60%		
					2.5x10 ⁹	nd	6 / 6 = 100%		
					2.0x10 ¹⁰	nd	2 / 2 = 100%		
Levine <i>et al.</i> , 1978, cité par Powell <i>et al.</i> , 2000 et par FSIS, 2001	EPEC O127:K63:H6, souche isolée de cas humain (enfant, épidémie)		NaHCO3		nd		10 ⁶	nd	0 / 4 = 0%
							10 ¹⁰	nd	3 / 5 = 60%
	EPEC O142:K86:H6 souche isolée de cas humain (enfant, épidémie)						10 ⁶	nd	1 / 5 = 20%
10 ⁸			nd		1 / 5 = 20%				
Levine <i>et al.</i> 1978 ou Bieber <i>et al.</i> 1998, cité par FSIS, 2001	EPEC O128		nd		nd		10 ¹⁰	nd	5 / 5 = 100%
							10 ⁶	nd	0 / 5 = 0%
							10 ⁸	nd	0 / 5 = 0%
Pai <i>et al.</i> , 1986	<i>E. coli</i> O157:H7, souche UC741 isolée à partir de cas humain	Jeunes lapins ne présentant pas de diarrhée	Suspension dans une solution avec 10% de bicarbonate de sodium (inoculation directe dans l'estomac par cathéter)	Diarrhée	10 ⁵	nd	1 / 3 = 33%		
					10 ⁶	nd	2 / 5 = 40%		
					10 ⁷	nd	5 / 5 = 100%		
					10 ⁸	nd	12 / 13 = 92%		
					10 ⁹	nd	5 / 5 = 100%		
					3.0x10 ⁹	nd	2 / 2 = 100%		
10 ¹⁰	nd	6 / 6 = 100%							

Tableau 9. Bilan des données d'épidémies à *E. coli* O157:H7 et des calculs publiés pour construire/valider une loi dose-réponse. n.d. : non déterminé.

Référence de l'épidémie	Information sur l'épidémie (espèce, souche, population...)	Référence des calculs dose-réponse	Commentaires sur les calculs <i>Italique : choix final du groupe de travail</i>	D _{moy} (ufc)	P _{mal} (nombre d'infectés / nombre d'exposés)	P _{mal} (nombre de malades / nombre d'exposés)
				Calculs publiés pour construire/valider une loi dose-réponse <i>Italique : Calculs retenus par le groupe</i>		
Shinagawa, 1997	Epidémie dans l'école élémentaire de Morioka city, au Japon, enfants et adultes	Teunis <i>et al.</i> , 2004 Nauta <i>et al.</i> , 2001 <i>Groupe de travail</i>	Bonne estimation de la dose, bon recensement des nombres d'exposés, infectés, malades. Remarque : les nombres de malades ne figuraient pas dans les calculs de Teunis <i>et al.</i> (2004) et Nauta <i>et al.</i> (2001) qui considéraient tous les infectés <i>Le groupe de travail retient les estimations ponctuelles (sans incertitude) et retient seulement les malades</i>	Enfants : 31	Enfants : 208/828 = 25%	Enfants : 114/828 = 14%
				Adultes : 35	Adultes: 7/43 = 16%	Adultes: 4/43 = 9%
Keene <i>et al.</i> , 1997	Epidémie "familiale" (<i>deer jerky</i>) dans l'Oregon aux USA	Haas <i>et al.</i> , 2000	Seuls les malades confirmés sont retenus, le cas secondaire (bébé non exposé) n'est pas exclu, le calcul est effectué par jour, la consommation est estimée 250g/ jour et la conta ^o à sa valeur minimale (3 ufc/g) ou maximale (93 ufc/g)	750 / jour (=250x3) ou 23250 / jour (=250x 93)	nd	6/13 (sur 2 jours) = 0,23 / jour
		Strachan <i>et al.</i> , 2005	Tous les malades (confirmés ou présumés) sont retenus, le cas secondaire est exclu, le calcul est effectué sur la durée totale de l'exposition, la consommation est estimée 200g au total et la conta ^o à sa valeur médiane (50 ufc/g)	10000 (=200x 50)	nd	10/12 = 83%
		<i>Groupe de travail</i>	<i>Rectangle d'incertitude recouvrant toutes les estimations (reconverties sur 2 jours pour Haas et al., 2000)</i>	10 000 – 46 500	nd	46% - 83%
Bell <i>et al.</i> , 1994	Epidémie 1992-1993, état de Wahsington, USA hamburgers d'une chaîne fast food	Powell <i>et al.</i> , 2000 FSIS, 2001 <i>Groupe de travail</i>	Seuls les malades consommateurs du steak de la chaîne incriminée sont retenus, prise en compte d'une sous-estimation du nombre de malades (facteur de 1 à 20) <i>Le groupe de travail retient ce rectangle d'incertitude</i>	1 - 926	nd	374/56337 - 7480/56337 = 0,66% - 13%
		Strachan <i>et al.</i> , 2005	Tous les malades sont retenus, prise en compte d'une sur-estimation (facteur de 10) du nombre de steaks contaminés	23	nd	398/5634 = 7%
Tilden et al 1996	Epidémie Salami	Strachan <i>et al.</i> , 2005	Relativement bonne estimation de la dose, imprécision sur le recensement des nombres d'exposés (calcul approximatif), et de malades (non prise en compte de la sous-estimation).	23	nd	17/2778 = 0,6%
		<i>Groupe de travail</i>	<i>Rectangle d'incertitude, avec incertitude sur la dose, le nombre d'exposés et le nombre de malades</i>	2 - 45	nd	17 / 23500 – 17x20/1248 = 0,07% – 27%
Warner <i>et al.</i> , 1996	Epidémie eau de baignade, Illinois, USA	Haas <i>et al.</i> , 2000	Le calcul est effectué par jour, la dose est vraisemblablement surestimée : la contamination est estimée égale au dénombrement minimal d' <i>E. coli</i> (660/100ml) et la consommation à 100ml / pers. / jour	660	nd	0,255/pers./jour
		Strachan et al 2005	Le calcul est effectué sur la durée de l'épidémie, la contamination est estimée égale à 10% du dénombrement médian d' <i>E. coli</i> (750/100ml) et la consommation à 100ml par personne <i>Le groupe de travail ne retient pas ces données</i>	75	nd	12/2350 = 0,5%
Strachan <i>et al.</i> 2001	Epidémie scouts	Strachan <i>et al.</i> 2001, 2005	Les hypothèses retenues sont très peu réalistes <i>Le groupe de travail ne retient pas ces données</i>	14	nd	20/228 = 9%
	Epidémie melon	Strachan <i>et al.</i> 2005	Peu d'informations disponibles <i>Le groupe de travail ne retient pas ces données</i>	1100	nd	32/71 = 45%
	Epidémie fromage	Strachan et al 2005	Peu d'informations disponibles <i>Le groupe de travail ne retient pas ces données</i>	380	nd	2/360=0,6%

3- Données provenant d'épidémies

Certaines épidémies liées au sérotype O157:H7 ont fait l'objet d'investigations approfondies de façon à pouvoir être utilisées dans la construction ou la validation d'une relation dose-réponse. Toutes les données présentées ci-dessous sont détaillées dans le tableau 2. Pour la suite de la validation, les données ont été retenues soit telles que présentées par les auteurs, soit accompagnées d'une incertitude.

3.1. Epidémie dans une école de Morioka, Japon (Shinagawa, 1997)

Il s'agit d'une épidémie liée à *E. coli* O157:H7 qui s'est produite en septembre 1996 au Japon (Shinagawa 1997). Les données recueillies et l'interprétation proposée par Teunis *et al.* (2004) et RIVM (1999) étaient très intéressantes puisque :

- l'école primaire dans laquelle s'est produite l'épidémie représentait une population bien définie et close. Le nombre et la caractérisation des personnes exposées étaient bien connus,
- il était possible de collecter les selles de tous les participants aux repas et donc de connaître le nombre de personnes infectées malades et non malades,
- les services de restauration japonais devaient conserver les plats témoins (portion de tous les aliments préparés et stockés au froid) en cas de besoin d'analyses, pendant au moins 15 jours. Ceci a permis d'estimer le nombre d'*E. coli* O157: H7 présents dans les plats témoins en faisant l'hypothèse que les historiques temps-température des aliments ingérés et des échantillons analysés étaient identiques,
- la quantité d'aliment ingérée était relativement bien estimée puisque les portions servies en collectivités étaient homogènes et que les enfants avaient dû finir leur repas.

Sur la base de ces connaissances, les auteurs ont tout d'abord estimé le nombre le plus probable de pathogènes présents dans les aliments analysés (4 à 18 ufc/100g selon les échantillons). Ils ont ensuite calculé la moyenne arithmétique (11 ufc/100g) et, connaissant les quantités d'aliments consommées par les enfants (225 à 320g, 280g en moyenne), ils ont pu estimer les doses moyennes ingérées. Le nombre exact de malades n'est pas précisé, mais il est indiqué que 55 % des personnes infectées étaient malades.

Cette publication est, à l'heure actuelle, la meilleure en terme de qualité des données disponibles. Toutefois, plusieurs réserves doivent être formulées. D'une part, il existe peu d'informations en ce qui concerne l'historique temps-température des échantillons analysés et des aliments ingérés. Les auteurs précisent que les échantillons analysés ont été conservés, avant analyse, pendant 8 jours à une température inférieure à 8°C (il existe donc une possible sous-estimation du nombre de pathogènes, liée au stress froid). Par contre, aucune information n'est disponible en ce qui concerne les échantillons ingérés. Si, avant d'être consommés, ils ont subi des variations de températures très différentes de celles subies par l'échantillon analysé, la détermination de la dose ingérée a pu être biaisée (par exemple, si ces échantillons ont été laissés à une température permettant la multiplication des *E. coli* O157: H7, la dose infectieuse a pu être sous-estimée). De plus, le dénombrement a été réalisé selon la méthode du nombre le plus probable et l'incertitude liée à ce calcul n'est pas prise en compte.

D'autre part, les portions servies sont dites « homogènes », or 900 repas ont été servis. La répartition des 900 assiettes a-elle été faite à partir d'une même préparation de sauce ou le volume total de sauce a-t-il été préparé en plusieurs fois ? Aucune information ne nous permet de répondre à ces questions. Enfin, concernant la détermination de la dose ingérée, l'information concernant le nombre d'échantillons analysés n'est pas connue et, de ce fait, la représentativité du niveau de contamination ne peut donc pas être appréciée.

Malgré ces remarques, cette publication est la plus intéressante pour les informations collectées et la qualité des données utilisées.

Nous avons choisi de retenir ces données telles quelles (cf. Tableau 9). Toutefois, afin de rendre possibles les comparaisons avec les autres investigations d'épidémies, les nombres de malades (plutôt que d'infectés) ont été retenus.

3.2. Epidémie due à la consommation de "Deer jerky", Oregon, USA (Keene *et al.* 1997)

Une toxi-infection alimentaire familiale à *E. coli* O157:H7, décrite par Keene *et al.* (1997) a été interprétée dans deux études différentes (Haas *et al.* 2000, Strachan *et al.* 2005). Cette épidémie, impliquant 11 cas de gastro-entérites (dont 6 cas confirmés à *E. coli* O157:H7) est survenue en novembre 1995. Dix des 11 malades, ainsi que 2 non malades, avaient consommé du "deer jerky", viande séchée de chevreuil (le 11^{ème} patient, un jeune enfant, avait vraisemblablement été contaminé par transmission de personne à personne). L'animal avait été abattu et éviscéré sur place, sa carcasse suspendue 5 jours à l'extérieur, démembrée puis découpée en fines tranches ; les tranches de viande avaient été marinées au réfrigérateur puis séchées dans un four sec. Le dénombrement a été réalisé par la méthode du nombre le plus probable (NPP) sur deux morceaux non consommés (3 et 93 ufc/g respectivement).

Haas *et al.* (2000) ont travaillé uniquement avec les malades confirmés (soit 6 malades), et n'ont pas exclu le cas secondaire (jeune enfant n'ayant pas consommé de "deer jerky"). Le nombre de malades a été divisé par la durée de l'exposition (2 jours). Le calcul de la dose ingérée a été effectué par jour de consommation, avec une quantité de viande ingérée par personne estimée à 250g/jour et en utilisant deux valeurs extrêmes pour le taux de contamination : une valeur minimale (3 ufc/g) et une valeur maximale (93 ufc/g).

Strachan *et al.* (2005) ont retenu tous les malades (confirmés et suspects), mais ont exclu le cas secondaire. Leur calcul a été effectué sur la durée totale de l'exposition, avec une estimation de la quantité de viande ingérée par personne pendant toute la période à 200g, et en choisissant une valeur de contamination médiane (50 ufc/g).

La différence principale entre les deux études porte sur le choix du nombre de malades retenus (confirmés seulement ou confirmés et suspects).

*Puisque aucune des hypothèses ne nous semble aberrante, et que nous ne sommes pas en mesure de choisir la valeur la plus pertinente, nous retenons l'ensemble de ces estimations comme une zone d'incertitude sur cette épidémie (voir Tableau 2). Les calculs de Haas *et al.* (2000), effectués par jour, sont multipliés par la durée de l'exposition (2 jours).*

3.3. Epidémie liée à la consommation de hamburgers en 1992 – 1993, USA (Bell *et al.* 1994)

Entre novembre 1992 et février 1993, plus de 500 personnes ont été malades suite à l'ingestion de viande de bœuf insuffisamment cuite, contaminée par *E. coli* O157:H7, et 4 décès ont été rapportés (Bell *et al.*, 1994 ; Tuttle *et al.*, 1999). Ces données ont ensuite été exploitées par trois études (FSIS, 2001; Powell *et al.* 2000; Strachan *et al.* 2005). La survenue de l'infection à *E. coli* O157:H7 était associée à la consommation de hamburgers provenant d'une même chaîne de restauration rapide. Pour l'Etat de Washington où la majorité des cas sont survenus, une enquête de suivi (traçabilité) de la production et de la distribution des steaks hachés entrant dans la composition des hamburgers, a permis de montrer que la majorité des steaks hachés incriminés avaient été préparés puis congelés le 19 novembre 1992. Pour les trois autres Etats touchés, les steaks hachés avaient été préparés à des moments différents au cours des journées des 19 et 20 novembre 1992. Sur les 34 lots de steaks hachés produits les 19 et 20 novembre 1992, 21 lots ont été testés pour la recherche d'*E. coli* O157:H7. Parmi les 7 lots détectés positifs, 6 ont permis d'obtenir une valeur de dénombrement en *E. coli* O157:H7, en utilisant la méthode du nombre le plus probable à trois tubes. A partir des valeurs maximales retrouvées par les auteurs, il est avancé que la contamination par steak haché avant cuisson était inférieure à 700 bactéries. Les auteurs suggèrent que cette valeur, la plus probable, pourrait être inférieure en raison des cinq autres valeurs de dénombrement plus faibles également retrouvées. Ils mettent également en avant que la production ayant été importante, il est possible que de nombreux lots non testés aient pu être plus fortement contaminés : seulement 76 échantillons analysés pour 140 tonnes de production et seulement 8 échantillons positifs pour des NPP variant de <0,3 à 15 /gramme. Par contre, les auteurs ne tiennent pas compte du fait que les échantillons avaient été au préalable congelés et ils partent de l'hypothèse qu'une cellule stressée sera systématiquement détectée après enrichissement - principe de la méthode NPP - en bouillon tryptone-soja modifié.

Dans cette étude, l'estimation de la population exposée manque de précision car il a été supposé que tous les steaks distribués avaient été contaminés et insuffisamment cuits. Il est, d'autre part, impossible de connaître le nombre d'*E. coli* O157:H7 ingéré par chaque personne et aucune information ne permet de caractériser les malades ni de connaître précisément la quantité de viande ingérée par malade. Enfin, le nombre de dénombrements réalisé est peu représentatif de la production et aucun historique temps-température ne permet d'apprécier les conditions de conservation et de service des 112 673 steaks hachés consommés (stress, croissance). Le travail d'investigation réalisé dans le cadre de cette étude est important, mais il n'apporte pas de données suffisamment précises pour être vraiment utiles.

Par la suite, ces données ont été reprises par Powell *et al.* 2000, qui ont pris en compte la cuisson et ont estimé que la contamination médiane était de 23 ufc par steak insuffisamment cuit, avec un intervalle de confiance à 95% : [1-926].

Nous avons choisi de retenir l'interprétation de FSIS (2001) et Haas *et al.* (2000) qui dessine une zone d'incertitude recouvrant toutes les autres estimations.

Pour FSIS, Food Safety and inspection service – USA, (2001), par exemple, une modélisation de la relation dose-réponse est réalisée à partir de données provenant de trois sources : (1) le nombre annuel estimé d'infections symptomatiques à *E. coli* O157:H7 lié à l'ingestion de viande de bœuf, (2) le nombre estimé de portions de viande de bœuf contaminées, (3) les limites supérieures et inférieures de la courbe dose-réponse correspondant à deux pathogènes « homologues » que sont *Shigella dysenteriae* et une souche EPEC. Dans un premier temps, la courbe dose-réponse issue des données d'expérimentation humaine a été définie pour chacun des deux pathogènes homologues. Cette limite supérieure et inférieure représente une enveloppe décrivant l'incertitude et dans laquelle la relation dose-réponse se situera pour *E. coli* O157:H7. Ensuite, les auteurs prennent en compte une distribution de l'exposition (saisonnalité) et une distribution annuelle du nombre de malades. Pour chacune de ces valeurs, le meilleur ajustement d'une loi de Poisson est réalisé en faisant varier les paramètres alpha et

bêta (ces paramètres étant contraints par les limites supérieures et inférieures de l'enveloppe). La valeur des paramètres résultant de la prévision du nombre total de malades sachant la distribution de l'exposition est sauvegardée et l'algorithme est répété une nouvelle fois. De cette façon, l'incertitude liée à l'exposition et au nombre total de malades par an est intégrée dans la courbe dose-réponse. Les résultats suggèrent que la fonction décrivant la relation dose-réponse pour *E. coli* O157:H7 se rapproche plus de *Shigella dysenteriae* que de la souche EPEC.

Nous avons choisi de retenir le rectangle d'incertitude du rapport FSIS (2001).

3.4. Epidémie liée à la consommation de salami, USA (Tilden, 1996).

Entre novembre et décembre 1994, 17 cas d'infections liées à *E. coli* O157:H7 ont été recensés (Etat de Washington et Californie). L'aliment incriminé était du salami séché et fermenté. Des données descriptives ont été obtenues pour quatre malades (âge, sexe, quantité de salami ingérée). La dose ingérée a été estimée entre 2 et 45 cellules par personne. Pour estimer cette dose, quatre dénombrements ont été réalisés début décembre sur des salamis provenant d'une partie de la production incriminée, et fabriquée le 25 août. Si les quatre échantillons analysés sont assez peu représentatifs de la quantité de salami produite, les valeurs retrouvées semblent toutefois assez homogènes (3 fois 0,3 et 1 fois 0,4 *E. coli* O157:H7 par gramme). C'est la valeur de dénombrement la plus élevée (0,4 ufc/g) qui a été utilisée pour le calcul du nombre de cellules ingérées. Le type de données collectées est intéressant, mais les données brutes ne sont pas toujours disponibles dans cette publication. Cependant, cet article présente l'intérêt de ne prendre en compte que les malades pour lesquels l'origine de l'infection a été identifiée comme étant la consommation au salami. Les malades liés à une transmission secondaire ou à une contamination croisée entre le salami et un autre aliment n'ont pas été pris en compte.

Par contre, le nombre de personnes exposées n'est pas réellement connu (basé sur l'estimation de la quantité consommée par personne) et il existe également un biais concernant la détection des malades (salami distribué sur une grande échelle).

Nous avons choisi de retenir ces données sous la forme d'un rectangle d'incertitude (cf. tableau 2). L'incertitude sur la dose D_{moy} est 2 – 45 ufc (comme proposé par Strachan). La borne inférieure sur la réponse P_{mal} est : $17/141\ 000 / 6 = 7,2 \cdot 10^{-4}$ (en supposant que tous les cas ont été recensés et que les 141 kilos ont tous été mangés par portions de 6 grammes). La borne supérieure est $17 \times 20 / 141\ 000 / 113 = 2,7 \cdot 10^{-1}$ (en supposant que seul 1 cas sur 20 a été recensé, voir III.3., et que les 141 kilos ont tous été mangés par portions de 113 grammes).

3.5. Epidémie liée à de l'eau de baignade, Illinois, USA (Warrner *et al.* 1996)

Cette épidémie, touchant 12 personnes durant l'été 1995, était liée à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignade dans un lac. L'utilisation des données pour la dose-réponse (Haas *et al.* 2000; Strachan *et al.* 2005) se heurte à trois problèmes majeurs :

- le nombre de personnes exposées est probablement surestimé
- la détermination de la quantité d'eau ingérée par les malades : l'hypothèse des deux auteurs est que les malades ont tous ingéré 100 ml d'eau.
- la quantification de la contamination en *E. coli* O157:H7 : deux dénombrements de *E. coli* totaux dans l'eau 4 jours avant l'épisode, ont donné en moyenne 750 ufc/100 ml (660 et 900 ufc/100 ml). Malgré l'absence d'isolement d'*E. coli* O157, Haas *et al.*, 2000 ont estimé que

100% des *E. coli* détectés étaient de *E. coli* O157. De leur côté, Strachan *et al.*, 2005 ont estimé que 10% des *E. coli* détectés étaient des O157.

Nous avons choisi de ne pas retenir ces données pour les raisons suivantes : 1- le nombre de personnes exposées est probablement surestimé : il nous semble peu réaliste de supposer que toutes les personnes présentes sur la plage d'un lac se soient réellement baignées, 2- la quantité d'eau ingérée par personne semble elle aussi surestimée, et enfin 3- les données de contamination sont totalement hypothétiques.

Par contre Haas *et al.* (2000) utilisent ces données dans le cadre de la validation des modèles mathématiques.

3.6. Epidémie au cours d'un camp scout, Ecosse (Strachan *et al.* 2001)

L'investigation d'une épidémie liée à *E. coli* O157 suite à un camp scout dans le nord-est de l'Ecosse a été l'occasion, pour les auteurs, d'estimer une dose infectieuse. Ce camp de scout s'était installé pendant deux jours (pluies abondantes le 2^{ème} jour) sur un terrain de 92 000 m² sur lequel avaient pâturé 300 brebis et agneaux pendant 6 jours. Les auteurs ont suggéré que l'infection des enfants était due à l'ingestion de particules de terre et, pour estimer l'exposition (dose ingérée), ceux-ci ont fait deux hypothèses :

- la première concerne le nombre d'*E. coli* excrétés par les 28 animaux testés (prélèvements et dénombrements réalisés 3 semaines après l'installation du camp scout), considéré comme représentatif du niveau d'excrétion des 272 autres animaux non testés. Ainsi, dans le but d'estimer le nombre d'*E. coli* O157 présents dans le sol au moment du camp, les auteurs se sont servi des résultats obtenus sur les 28 animaux testés. Ils ont ensuite utilisé les résultats provenant de quatre publications décrivant le devenir des *E. coli* O157 dans les fèces de bovins (lisier à 22°C et 37°C) et le temps de réduction décimale à la température de +5°C pour remonter au nombre de pathogènes présents au moment de la survenue de l'épidémie (soit 3 semaines auparavant).
- la seconde hypothèse concerne le fait que les fèces des animaux, et donc les *E. coli* O157, sont uniformément répartis dans le 1^{er} cm de la surface du sol. La quantité de sol ingéré ayant été estimée entre 30 et 200 mg / 24 heures (van Wijnen, Clausing *et al.* 1990), la dose a été estimée entre 4 et 24 *E. coli* O157. Très peu d'informations sur les modalités de dénombrement sont disponibles dans la publication.

Les auteurs ont donc déterminé une exposition avec une précision étonnante, malgré des hypothèses assez peu réalistes et une incertitude considérable sur un grand nombre de paramètres.

Nous avons choisi de ne pas retenir ces données.

3.7. Autres épidémies

Deux autres épidémies sont citées par Strachan (Strachan *et al.* 2005) :

- Epidémie liée à la consommation de melon au Japon.
- Epidémie liée à la consommation de fromage au Royaume Uni.

Nous avons choisi de ne pas retenir ces données, par manque d'informations plus précises.

4– Modèles utilisés

4.1. Généralités

Plusieurs équations mathématiques ont été publiées pour modéliser la probabilité (P) de l'apparition d'un effet en fonction de la dose ingérée (D) d'un agent pathogène. Ces modèles prennent en compte un nombre de paramètres plus ou moins importants et des hypothèses variées. Ils ont été développés grâce aux études citées ci-dessus (modèles animaux, volontaires humains, épidémies). Une fois ces modèles mathématiques établis, des données provenant d'investigations d'épidémies sont utilisées pour comparer le résultat obtenu en conditions réelles (plus ou moins bien définies) au résultat estimé avec le modèle étudié (les données utilisées pour la validation ne sont pas celles utilisées pour construire le modèle).

Les modèles dose-réponse ne sont pas tous équivalents. Quelques-unes des caractéristiques recherchées pour un modèle concernant son adéquation avec les données provenant de la littérature, sa simplicité (sans toutefois sacrifier à sa qualité), son adaptabilité à une grande diversité de conditions et sa flexibilité pour s'adapter à plusieurs pathogènes différents (Holcomb, Smith *et al.* 1999).

De plus, la probabilité (P) modélisée peut être soit la probabilité infection (que nous proposons de noter P_{inf}) soit la probabilité de maladie (que nous proposons de noter P_{mal}). Par ailleurs, la dose ingérée (D) peut être exprimée soit au travers de la dose moyenne (D_{moy}), *i.e.* le nombre de cellules ingérées en moyenne par individu, cette moyenne étant calculée sur l'ensemble d'une population exposée, soit de la dose individuelle (D_{ind}), *i.e.* le nombre de cellules réellement ingérées par un individu. On retiendra que D_{ind} est toujours un nombre entier tandis que D_{moy} peut être fractionnaire et très inférieur à 1. Ainsi, une dose moyenne D_{moy} de 0,001 ufc/portion signifie qu'en moyenne chaque individu ingère 0,001 ufc, cela peut correspondre par exemple à une situation dans laquelle un individu ingère réellement une dose individuelle D_{ind} de 1 ufc, et que 999 autres individus "exposés" n'ingèrent en réalité aucune ufc, c'est à dire qu'une portion sur mille est réellement contaminée.

Le modèle le plus simple est le modèle exponentiel. Il est mécaniste au sens où sa construction repose sur des hypothèses biologiques :

- La dose individuelle D_{ind} suit une loi de Poisson de moyenne la dose moyenne D_{moy}
- Les cellules sont indépendantes les unes des autres
- Toutes les cellules ont la même probabilité individuelle de survivre jusqu'à initier un processus infectieux, cette probabilité étant égale à r
- Le nombre minimal de cellules nécessaires pour initier un processus infectieux est égal à 1.

On observera que, sous ces hypothèses, la DMI (dose minimale infectieuse ou infectante) théorique devient égale à 1 cellule, quel que soit le danger considéré. Dans le cas d'*E. coli* O157:H7, le groupe de travail a accepté cette hypothèse.

Sous ces hypothèses, il est aisément démontrable (Haas *et al.*, 1999) que :

$$P_{inf} = 1 - \exp(-r \cdot D_{moy})$$

Le modèle bêta-Poisson (Haas, Rose *et al.* 1999) a été construit empiriquement sur la base des hypothèses du modèle exponentiel, en supposant toutefois que la probabilité de survie d'une cellule (r) est variable (et non fixe), et qu'elle suit une loi *Bêta* de paramètres α et β . De ces hypothèses découle l'équation exacte du modèle bêta-Poisson, aussi appelé modèle hypergéométrique, puisqu'il fait appel à la fonction hypergéométrique confluyente. Cette équation exacte (non présentée ici) peut être simplifiée sous une forme approximative sous certaines conditions d'application :

$$P_{\text{inf}} = 1 - \left(1 + \frac{D_{\text{moy}}}{\beta} \right)^{-\alpha} \quad \text{lorsque } \beta \gg 1 \text{ et } \alpha \ll \beta$$

D'autres modèles ont été proposés et ne sont pas détaillés ici, une revue complète peut être trouvée dans Haas *et al.*, 1999.

On notera que les hypothèses biologiques sous-jacentes ne justifient l'utilisation de ces équations que pour exprimer $P = P_{\text{inf}}$ en fonction de $D = D_{\text{moy}}$. Or, comme cela a déjà été mentionné plus haut, ces mêmes équations sont fréquemment utilisées pour $P = P_{\text{mal}}$, sans qu'il ne soit explicité qu'elle repose alors sur d'autres hypothèses (ou qu'elles perdent leur justification mécaniste), puisque r (fixe ou suivant une loi bêta) ne correspond alors plus à la probabilité individuelle de survivre jusqu'à initier un processus infectieux, mais à la probabilité individuelle de déclencher la maladie.

Par ailleurs, même si la construction des modèles (estimation du ou des paramètres) repose toujours sur $D = D_{\text{moy}}$, différentes interprétations ont été proposées pour l'utilisation des lois dose-réponse ($D = D_{\text{ind}}$ ou $D = D_{\text{moy}}$), voir Canivet (2005). Lorsque D_{ind} est supposée connue ou est simulée dans l'étape de caractérisation de risque, la probabilité d'infection (P_{inf}) ou la probabilité de maladie (P_{mal}) pour cette dose D_{ind} peut être calculée selon :

$$P_{\text{inf}} = 1 - (1 - r)^{D_{\text{ind}}}$$

C'est la démarche retenue dans la caractérisation de risque présentée plus loin.

4.2. Modèles construits à partir des données extraites d'épidémies publiées

Les caractéristiques des modèles dose-réponse détaillés dans les paragraphes suivants sont reprises de façon synthétique dans le tableau 10.

- **Modèle de Teunis *et al.*, 2004. Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data.** Teunis *et al.* ont construit deux modèles dose-infection bêta-Poisson (forme exacte, avec $P = P_{\text{inf}}$) d'après l'épidémie décrite par Shinagawa *et al.*, 1997 (cf. III.1.) : un modèle pour les enfants et un modèle pour les adultes (Teunis, Takumi *et al.* 2004). Ces modèles sont fortement limités par le fait qu'on ne dispose que d'une donnée par modèle (même si cette donnée est solide, cf. III.1.). Ils présentent ainsi une forte incertitude dans les domaines éloignés de la donnée. On constate par exemple que la DI_{50} (dose moyenne conduisant à l'infection de 50% des exposés) pour les enfants est 200 fois plus faible que celle des adultes, alors que les données sont très proches.
- **Modèle de Strachan *et al.*, 2005. Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks.** Les auteurs ont choisi de construire un modèle dit dose-infection, mais ils l'ont en fait ajusté sur une majorité de données dose-maladie (sauf les données dose-infection de l'épidémie décrite par Shinagawa *et al.*, 1997). Nous supposons donc que l'effet modélisé est la maladie. Outre cette incohérence, les données ont été construites avec un grand nombre d'approximations, voire d'aberrations (voir § III.5). Ces données ont été ajustées par un modèle exponentiel et les deux formes (exacte et simplifiée) du modèle bêta-Poisson, avec $P = P_{\text{mal}}$ (avec les réserves émises ci-dessus). Le modèle exponentiel ne

s'ajuste pas de façon satisfaisante. L'ajustement du modèle bêta-Poisson modifié (cf. tableau 10) semble satisfaisant, avec une grande proximité entre les formes exacte et simplifiée.

4.3. Modèles construits à partir de données *Shigella* sur des volontaires sains

Différents modèles ont été construits sur les données expérimentales (*Shigella* sur des sujets volontaires sains), soit sur les données de Levine *et al.* (1973) (seulement *S. dysenteriae*), soit sur les données de DuPont (1969, 1972) (*S. dysenteriae* et *S. flexneri*). Il s'agit des modèles de Haas *et al.*, 1983 (Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies), Crockett, *et al.*, 1996 (Prevalence of shigellosis in the U.S.: consistency with dose-response information), Powell *et al.*, 2000 (Dose-response envelope for *Escherichia coli* O157:H7), et Cassin *et al.*, 1998 (Quantitative risk assessment for *E. coli* O157:H7 in ground beef hamburgers). Tous travaillent sur P_{mal} , et les trois premiers utilisent des modèles bêta-Poisson. Cassin *et al.*, 1998, ont proposé une modification du modèle bêta-Poisson (puisque β , un des 2 paramètres de la loi bêta sur r , n'est pas fixe mais suit une loi normale). De plus, ils introduisent la notation D pour désigner la dose individuelle (que nous notons D_{ind}).

4.4. Modèles construits à partir d'autres approches

- **Modèle de Powell et al. 2000. Dose-response envelope for *Escherichia coli* O157:H7.**

Powell utilise les données de Levine, 1978 et Bieber, 1998 sur les EPEC. Il rejette le modèle exponentiel mais réussit à ajuster un modèle bêta-Poisson pour P_{mal} . Le passage au modèle Weibull-Gamma n'améliore pas l'ajustement de façon significative.

Il propose ensuite une démarche originale, reprise dans le rapport FSIS (2001). Il décrit la loi dose réponse d'*E. coli* O157:H7 non pas par une courbe unique, mais par une enveloppe de courbes, indiquant la zone d'incertitude sur la loi dose-réponse. L'enveloppe proposée est définie d'un côté par la loi bêta-Poisson ajustée sur des données humaines associées à des *Shigella* (cf. IV.3.) et de l'autre côté par la loi bêta-Poisson ajustée sur des données humaines avec des EPEC.

Les auteurs considèrent ainsi que du fait qu'*E. coli* O157:H7 partage des facteurs de virulence à la fois avec les EPEC et avec les *Shigella*, sa loi dose-réponse doit se situer entre les 2 lois dose-réponse obtenues pour les EPEC et les *Shigella*.

De plus, les auteurs proposent une estimation de courbe la plus probable pour *E. coli* O157:H7 calculée par simulations de Monte Carlo réalisées à partir de données épidémiologiques humaines et du calcul d'exposition décrit dans le rapport FSIS. Cette courbe la plus probable estimée se trouve à peu près au centre de l'enveloppe définie précédemment. Les auteurs considèrent qu'étant donné le manque de données relatives à *E. coli* O157:H7, il est plus raisonnable de considérer cette enveloppe dans les évaluations quantitatives des risques que de considérer une courbe dose-réponse unique très grossièrement validée par des données épidémiologiques. Ils soulignent que cette enveloppe sous-estime même peut-être encore l'incertitude sur cette loi, du fait par exemple que les données humaines concernant les EPEC et les *Shigella* n'ont été obtenues que sur de jeunes hommes en bonne santé, qui ne sont pas représentatifs de la population générale.

Cette approche ne permet pas d'obtenir un modèle quantitatif de relation dose-réponse.

- **Modèle de Haas *et al.*, 2000. Development of a dose-response relationship for *E. coli* O157:H7.**

Les auteurs utilisent un jeu de données expérimentales sur des lapins âgés de 2 à 3 jours infectés par *E. coli* O157 pour ajuster un modèle bêta-Poisson. Ils tentent de valider l'utilisation de ce modèle à partir de données épidémiologiques humaines (Warrner, Kuo *et al.* 1996; Keene, Sazie *et al.* 1997). Dans le cadre de leur étude, ils montrent que les paramètres du modèle bêta-Poisson obtenu à partir

d'expérimentations réalisées sur de jeunes lapins sont plus proches de ceux ajustés sur des données humaines concernant des EPEC que de ceux ajustés sur des données humaines concernant l'espèce *Shigella* (Crockett, Haas *et al.* 1996).

Les éléments relatifs à ces modèles sont répertoriés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Modèles dose-réponse publiés, avec r : probabilité de l'effet étudié si ingestion d'1 cellule

Référence	Effet étudié	Modèle	Paramètres
Modèles ajustés sur données d'épidémies			
Teunis <i>et al.</i> , 2004	Infection	bêta -Poisson : r suit une loi bêta (α, β) ; et P(maladie/infection) = 0.55	Population adulte $\alpha=0,050$; $\beta=1,001$ Population enfants $\alpha=0,084$; $\beta=1,44$;
Strachan, 2005	Essentiellement maladie	bêta -Poisson : r suit une loi bêta (α, β) et le nombre de cas suit une loi binomiale de paramètre p avec p issu de la loi bêta ($P_{mal}/\theta; (1-P_{mal})/\theta$)	$\alpha=0,0565$; $\beta=2,5487$ et $\theta = 0,3758$
Modèles ajustés sur données <i>Shigella</i> / volontaires sains			
Crockett <i>et al.</i> , 1996 et limite à gauche de l'enveloppe (Powell <i>et al.</i> 2000)	Maladie	bêta -Poisson : r suit une loi bêta (α, β)	$\alpha=0,162$; $\beta=15,86$
Cassin <i>et al.</i> , 1998	Maladie	bêta -Poisson : r suit une loi bêta (α, β) et β suit une loi log-normale	$\alpha=0,267$ et $\ln \beta \sim \text{Normal}(5,435; 2,47)$
Modèle ajusté sur données EPEC / volontaires sains			
Powell, 2000 : limite à droite de l'enveloppe	Maladie	bêta -Poisson : r suit une loi bêta (α, β)	$\alpha=0,221$; $\beta=3,112 \cdot 10^6$
Modèle ajusté sur données O157:H7 / lapins			
Haas <i>et al.</i> , 2000	Maladie	bêta -Poisson : r suit une loi bêta (α, β)	$\alpha=0,49$; $\beta=191\ 346$

4.5. Comparaison des modèles et des données

La figure 8 présente l'ensemble des données disponibles (concernant les épidémies, seules les données retenues par le groupe sont présentées) ainsi qu'une sélection de modèles dose-maladie.

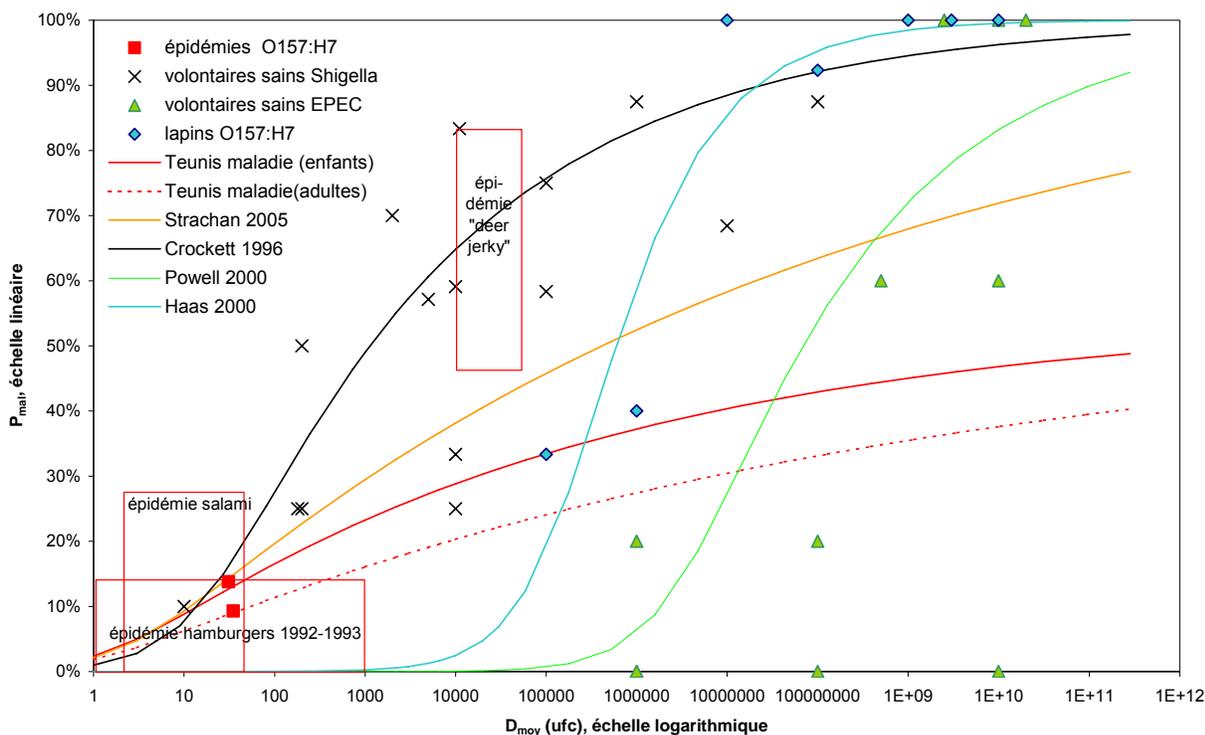
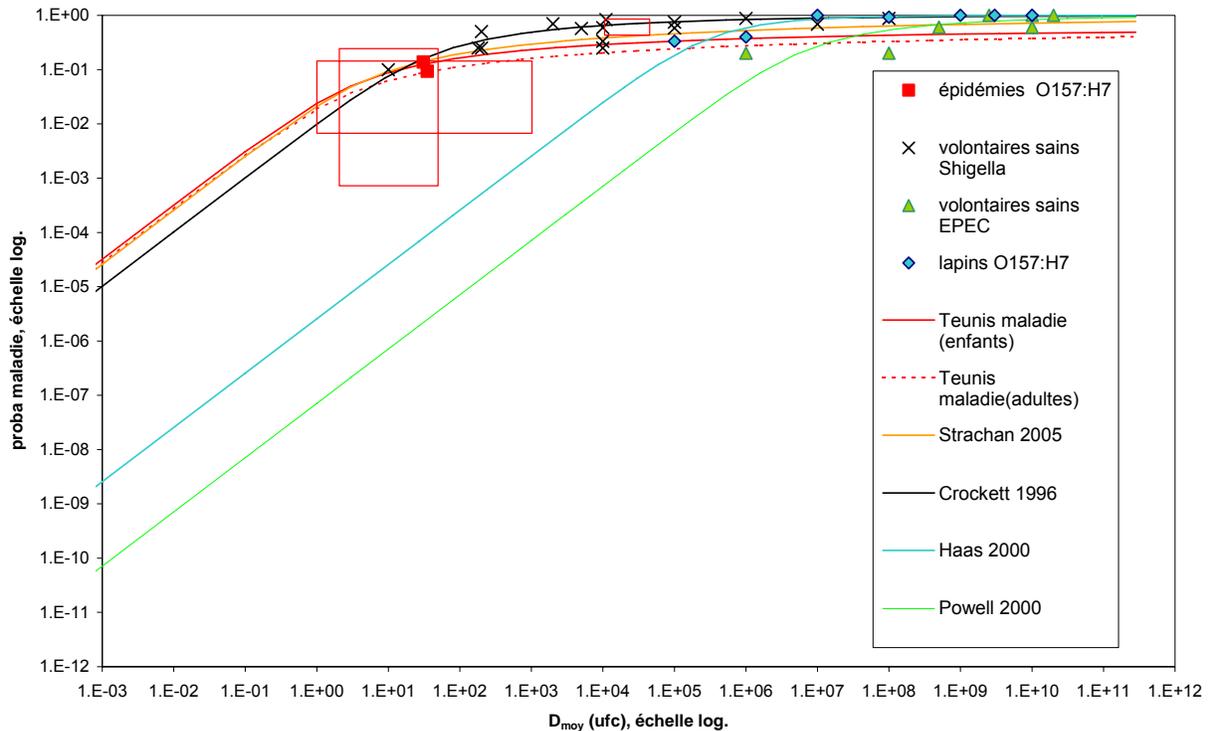


Figure 8 : Représentation graphique d'une sélection de données potentiellement pertinentes pour l'évaluation de la loi dose-réponse (P_{mal} en fonction de D_{moy}) pour *E. coli* O157:H7 (coordonnées semi-logarithmiques). Trois épidémies sont représentées par des "rectangles d'incertitude". Le modèle dose-infection de Teunis *et al.* (2004) a été modifié, en utilisant la probabilité de maladie parmi les infectés de 55%. Seule la partie droite de l'enveloppe de Powell *et al.* (2000), celle correspondant aux EPEC, est représentée. Pour les autres modèles, seule la partie centrale ou médiane (sans incertitude) est représentée.

La représentation semi-logarithmique de la figure 8 (celle la plus couramment retrouvée dans la littérature) ne permet pas de bien appréhender les faibles probabilités aux faibles doses moyennes. C'est pourquoi nous recommandons, comme dans la figure 9, d'utiliser aussi la transformation logarithmique pour l'axe des ordonnées. De plus, contrairement à l'habitude, nous représentons les doses fractionnaires inférieures à 1 cellule, interprétables comme une probabilité de fréquence. Rappelons que l'abscisse représente D_{moy} et non D_{ind} .

Figure 9 : Représentation graphique des modèles dose-maladie (P_{mal} en fonction de D_{moy}) et des données d'épidémies (coordonnées logarithmiques). Trois épidémies sont représentées par des "rectangles d'incertitude". Le modèle dose-infection de Teunis *et al.* (2004) a été modifié, en utilisant la probabilité de maladie parmi les infectés de 55%. Seule la partie droite de l'enveloppe de Powell *et al.* (2000), celle correspondant aux EPEC, est représentée. Pour les autres modèles, seule la partie centrale ou médiane (sans incertitude) est représentée.



Au vu de ces représentations graphiques, il apparaît clairement que les données EPEC/Volontaires sains (en vert) et O157:H7/Lapins (en bleu) sont éloignées des données O157:H7/Epidémies (en rouge). Les modèles qui en découlent (même code couleur) ne semblent donc pas pertinents pour *E. coli* O157:H7, d'autant qu'ils sont non sécuritaires aux faibles doses.

En revanche, les données *Shigella*/Volontaires sains (en noir) semblent relativement proches des données O157:H7/Epidémies. Les modèles construits sur ces données pourraient donc être intéressants. Le modèle retenu est celui de Crockett, 1996.

Enfin, les modèles construits sur des données d'épidémies (Teunis *et al.* 2004, Strachan *et al.* 2005) semblent coïncider relativement bien avec les données retenues, au moins aux faibles doses, malgré leur construction peu solide (les premiers n'étant fondés que sur une donnée chacun, le deuxième sur un ensemble d'épidémies dont certaines utilisent des données peu fiables). Toutefois, les valeurs élevées de P_{mal} observées pour l'épidémie familiale liée à la consommation de "deer jerky" ne sont pas bien prévues. Ceci semble dû à leur forme très éloignée de l'approximation linéaire, ou du modèle exponentiel, pour ces doses moyennes de 10 000 à 100 000 ufc. De plus, le modèle de Teunis modifié a, par construction, une asymptote à 55% (probabilité de maladie sachant infection). Cette observation ne nous conduit pas à rejeter totalement ces modèles, pour une utilisation sur des faibles doses, mais à nous interroger sur la pertinence des hypothèses sous-jacentes.

A défaut de modèle parfaitement validé, il est possible de retenir un petit ensemble de modèles (l'un construit sur données *Shigella*, Crockett, 1996, et deux sur données d'épidémies, modèle de Teunis *et*

al. 2004 appliqué aux enfants et modifié pour que l'effet étudié soit la maladie et modèle de Strachan *et al.* 2005) et de les comparer dans l'étape d'estimation du risque. La différence entre les modèles représente notre incertitude de modélisation sur l'appréciation des effets.

5– Relation maladie-SHU-décès

5.1. Probabilité de développer un SHU sachant que le patient présente une maladie à *E. coli* O157

Une revue de la littérature montre que la proportion de malades infectés par *E. coli* O157:H7 qui évoluent vers un SHU, tout âge confondu, varie de 3% à 10% dans les séries de cas sporadiques (Lopez *et al.* 1989, MacDonald *et al.* 1996, Derval *et al.* 2001) et jusqu'à 20% dans certaines épidémies (Griffin *et al.* 1991, Mead *et al.* 1998).

Cette proportion varie en fonction de l'âge du malade : de 4 % chez les patients âgés de plus de 10 ans à 25 % chez les patients âgés de moins de 10 ans (Ostroff *et al.* 1989). La proportion moyenne a été estimée à environ 15% chez les enfants de moins de 10 ans (Tarr *et al.*, 2005).

Les modalités du système de surveillance du SHU chez l'enfant en France ne permettent pas de déterminer cette proportion, car il n'existe pas à actuellement de surveillance des infections à *E. coli* O157 :H7, autre que celle qui repose sur les SHU.

Peu de publications sur les données de surveillance dans les autres pays d'Europe permettent d'obtenir cette proportion par classe d'âge. A titre d'exemple, les proportions suivantes ont pu être extraites à partir de deux articles : $P(\text{SHU}/\text{maladie}) = 10 \%$ chez les 0-5[ans et 31 % chez les [5-16[ans (Wagner *et al.* 2004) et $P(\text{SHU}/\text{maladie}) = 4 \%$ chez les 0-5[ans et 2 % chez les [5-16[ans (Havelaar *et al.* 2004).

Par ailleurs, à partir des données publiées de surveillance des infections à *E. coli* O157:H7 et des données sur les épidémies d'infections à *E. coli* O157:H7 liées à la consommation d'aliments d'origine bovine, ont été extraits le nombre de malades, le nombre de cas de SHU et le nombre de décès. Les proportions de cas de SHU parmi les malades ont ensuite été calculées (Tableau 11).

Tableau 11 : Données disponibles sur les infections à *E. coli* O157:H7 pour étudier les relations maladie-SHU-décès, à partir de la littérature internationale

Références	STEC	Nombre d'exposés	Nombre de malades	Nombre de SHU	Proportion de SHU parmi les malades (en %)	Nombre de décès	Proportion de décès parmi les malades (en %)	Commentaires
Données de surveillance								
Bender <i>et al.</i> 2004	O157		1734	91	5,2	16	0,9	Etats-Unis (Foodnet) 1996-1999
NDSC 2003 Ireland	O157		68	5	7,3	0	-	Irlande 2002
Gerber <i>et al.</i> 2002	O157		nd	117	-	4	3,4 *	Allemagne-Autriche 1997-2000 / enfants
Tozzi <i>et al.</i> 2003	O157		nd	74	-	?		Italie 1998-2000 / enfants
Scheutz <i>et al.</i> 2001	O157		43	9	20,9	0	-	Danemark 1997-2000
Thomas <i>et al.</i> 1996	O157		1266	59	4,7	nd	-	Angleterre et Pays Galles 1992-1994
Mc Donald <i>et al.</i> 1996	O157		92	8	8,7	4	4,3	Écosse 1987-1989
Coia <i>et al.</i> 1995	O157		749	58	7,7	18	2,4	Écosse 1984-1993
Thomas <i>et al.</i> 1993	O157		1230	193	15,7	0	-	Angleterre 1989-1991
Waters <i>et al.</i> 1999	O157		1993	115	5,8	24	1,2	Ecosse 1987-1991
Slustker L <i>et al.</i> 1998	O157		93	7	7,5	1	1,1	Etats-Unis 1990-1992
Rowe <i>et al.</i> 1993	O157		nd	26	-	1	2,9 *	Canada 1990 / enfants (étude 4 mois)
Ostroff <i>et al.</i> 1989	O157		93	11	11,8	1	1,1	Etats-Unis (Washington) 1987
MacDonald <i>et al.</i> 1988	O157		25	0	-	0	-	Etats-Unis 1985-1986
Pai <i>et al.</i> 1988	O157		130	2	1,5	0	-	Canada 1984-1986 (étude)
Rivas <i>et al.</i> 2006	O157		nd	61	-	9	15 *	Argentine 2002
IASR 1997	O157		2687	26	1,0	-		Japon 1996
IASR 1996	O157		379	29	7,6	-		Japon 1991-1995
CPSP 2002	O157		nd	81	-	4	4,9 *	Canada 2000-2002
Manning <i>et al.</i> 2007	O157		401	10	2,5	0	-	Etats-Unis (Michigan) 2001-2005
Remis <i>et al.</i> 1984	O157		28	2	7,1	-		Etats-Unis 1982-1984
Wagner <i>et al.</i> 2004	O157		102	9	8,8	0	-	Autriche 1999-2002
Espié <i>et al.</i> 2007	O157		nd	488	-	6	1,2*	France 1996-2006 / enfants

Références	STEC	Nombre d'exposés	Nombre de malades	Nombre de SHU	Proportion de SHU parmi les malades (en %)	Nombre de décès	Proportion de décès parmi les malades (en %)	Commentaires
Données d'épidémies liées aux aliments d'origine bovine								
Willshaw <i>et al.</i> 1997	O157	nd	63	7	11,1	2	3,2	Données 6 épidémies Angleterre et Pays de Galles 1995 / origine alimentaire
Thomas <i>et al.</i> 1993	O157	nd	23	3	13,0	0	-	Epidémie Angleterre 1991 / Steak haché
Griffin <i>et al.</i> 1988	O157	nd	113	14	12,4	24	21,2	Données 4 épidémies 1982-1986 Etats-Unis / Steak haché
IASR 1997	O157	nd	468	2	0,4	2	0,4	Epidémie Japon (Oku-cho Okayama) 1996
CDC 1997	O157	nd	15	0	-	0	-	Epidémie Etats-Unis (Colorado) 1997 / Hamburger
CDC 2002	O157	nd	18	2	11,1	0	-	Epidémie Etats-Unis (Colorado) 2002 / Viande hachée
Cowden <i>et al.</i> 2001	O157	nd	512 (279 confirmés)	34	6,6	17	3,3	Epidémie Ecosse 1996 / Viandes
Mc Donnell <i>et al.</i> 1997	O157	nd	26	2	7,7	0	-	Epidémie Angleterre 1995 / Sandwich avec de la viande de boeuf
Cieslak <i>et al.</i> 1997	O157	nd	58	3	5,2	0	-	Epidémie Etats-Unis 1992-93 / Hamburger
Bell <i>et al.</i> 1994	O157	nd	501	45	9,0	3	0,6	Epidémie Etats-Unis 1992-93 / Hamburger
Rodrigue <i>et al.</i> 1995	O157	nd	61	0	-	0	-	Epidémie Etats-Unis 1988 / Rôti de boeuf
Orr <i>et al.</i> 1994	O157	5292	152	22	14,5	2	1,3	Epidémie Canada 1991 / Viande hachée
Belongia <i>et al.</i> 1991	O157	1562	32	0	-	0	-	Epidémie Etats-Unis 1988 / Viande hachée
Pavia <i>et al.</i> 1990	O157	nd	51	8	15,7	4	7,8	Epidémie Etats-Unis (Utah) 1987 / Steak haché
CDC 1993	O157	nd	583	41	7,0	4	0,7	Epidémie Etats-Unis 1992-93 / Hamburger
Ryan <i>et al.</i> 1986	O157	101	28 (6 confirmés)	1	3,6	4	14,3	Epidémie Etats-Unis 1984 / Hamburger
RMTC 2004	O157	123	27 (11 confirmés)	1	3,7	0	-	Epidémie Canada 2004 / Hamburger
Jay <i>et al.</i> 2004	O157	nd	13	3	23,1	0	-	Epidémie Etats-Unis (Californie) 1999 / Viande hachée
Rangel <i>et al.</i> 2005	O157	nd	1760	97	5,5	nd	-	Données 75 épidémies 1982-2002 Etats-Unis/ Steak haché
Doorduyn <i>et al.</i> 2006	O157	nd	20	0	-	0	-	Epidémie Pays-Bas 2005 / Steak tartare
King <i>et al.</i> 2007	O157	nd	69	17	24,6	0	-	Epidémie France 2005 / Steak haché

nd : non déterminé ; * Proportion de décès parmi les cas de SHU

5.2. Probabilité de décéder sachant que le patient présente un SHU

La létalité consécutive à un SHU varie de moins de 1% à 3% (Tozzi *et al.* 2003, Gerber *et al.* 2002] et peut atteindre 6% chez les enfants de moins de 5 ans (Griffin *et al.* 2001).

En France, cette létalité est en moyenne de 1%, sur la période 1996-2006 (Espié *et al.*, 2007). La létalité suite à un SHU lié à une infection à *E. coli* O157, varie en fonction de l'âge :

- chez les enfants âgés de 0 à 4 ans : $P(\text{décès}/\text{SHU}) = P(4/364) = 1,1 \%$
- chez les enfants âgés de 5 à 9 ans : $P(\text{décès}/\text{SHU}) = P(2/95) = 2,1 \%$
- chez les enfants âgés de 10 à 15 ans : $P(\text{décès}/\text{SHU}) = P(0/29) = 0 \%$

Ces valeurs sont comparables à celles observées dans d'autres pays européens. Elles peuvent cependant être légèrement surestimées, car le réseau de surveillance n'est pas exhaustif, même si son efficacité est considérée comme bonne (Espié *et al.* 2006).

A partir des données publiées de surveillance des infections à *E. coli* O157:H7 et celles sur les épidémies d'infections à *E. coli* O157:H7, le taux de létalité a été calculé chez les malades ou chez les cas de SHU (Tableau 4).

5.3. Choix des valeurs susceptibles d'être introduites dans l'AQR

Afin de déterminer des valeurs cohérentes susceptibles d'être introduites dans l'AQR, les données détaillées dans le tableau 11 ont été analysées; les données les plus anciennes ont été écartées et nous nous sommes basés sur les publications américaines récentes (Bender *et al.* 2004, Rangel *et al.* 2005) qui montrent des probabilités, quel que soit l'âge, variant de 4 % à 5,6 % pour $P(\text{SHU}/\text{maladie})$ et de 0,5 à 0,8% pour $P(\text{décès}/\text{SHU})$. Nous avons donc choisi d'utiliser les valeurs suivantes :

- $P(\text{SHU}/\text{maladie}) = 8 \%$ à 12% pour les enfants âgés de moins de 5 ans et 2% à 5% pour les enfants âgés de 5 à 15 ans,
- $P(\text{décès}/\text{SHU}) = 0,5$ à 1% pour les enfants âgés de moins de 16 ans.

5.4. Données provenant de l'épidémie française de 2005

Après l'épidémie survenue en 2005 dans le Sud-Ouest de la France, une étude de cohorte rétrospective a été réalisée pour recenser tous les malades au sein des 55 familles identifiées (King, *et al.* 2007). Quarante six familles ont répondu aux questionnaires envoyés. Parmi les 153 personnes exposés, 85 (56%) ont été malades ; 33 patients ont présenté une diarrhée non sanglante, 27 une diarrhée sanglante et 17 un SHU. Aucun décès n'a été rapporté lors de cette épidémie.

A partir des données précédentes, il est possible de calculer une probabilité de développer un SHU à la suite d'une infection à *E. coli* O157:H7 :

- pour les enfants de moins de 5 ans, $P(\text{SHU}/\text{maladie}) = 11/34 * 100 = 32 \%$
- pour les enfants âgés de 5 à 15 ans, $P(\text{SHU}/\text{maladie}) = 5/22 * 100 = 23 \%$
- quel que soit l'âge, $P(\text{SHU}/\text{maladie}) = 29 \%$

On notera que ces valeurs sont très supérieures à celles obtenues pour les cas sporadiques. Par contre, ces valeurs observées semblent proches des valeurs publiées pour les épidémies, jusqu'à 20% (Griffin *et al.* 1991, Mead *et al.* 1998). Cependant, elles sont sûrement surestimées car si l'identification des cas graves hospitalisés ou non (SHU et diarrhée sanglante) a été quasi-

exhaustive, il n'a pas été possible de recenser l'ensemble de la population exposée, ni celle de la totalité des malades, ceci malgré la forte médiatisation de cette épidémie.

6- Discussion

Le type de modèle mathématique mis en oeuvre, les hypothèses sous-jacentes associées à ces modèles, les données provenant d'infections expérimentales et le pathogène utilisé lors des essais, la qualité et le type de données épidémiques utilisées pour vérifier l'ajustement du modèle dose-réponse sont importants.

A ce jour, aucun consensus clair n'existe sur le fait que tel modèle mathématique serait mieux adapté qu'un autre à l'évaluation de la relation dose-réponse chez les STEC et en particulier *E. coli* O157:H7.

6.1. Limites liées aux données expérimentales

Les hypothèses biologiques doivent être simples, et refléter le mieux possible la réalité.

Par ailleurs, les modèles dose-réponse actuellement utilisés sont difficilement extrapolables et s'adaptent mal à de nouvelles conditions ou à l'étude de facteurs supplémentaires. Ainsi, les essais de contaminations sur des volontaires humains ne peuvent être réalisés pour des pathogènes hautement infectieux. Les volontaires sont des adultes en bonne santé et donc non représentatifs de la population générale, voire de la population la plus susceptible (enfants, personnes âgées). Le pathogène ingéré est généralement préparé à partir de cultures bactériennes réalisées en laboratoire et qui possèdent des caractéristiques différentes de celles retrouvées lors de l'ingestion de l'aliment.

Par exemple, Chen *et al.* (2006) ont montré pour *Campylobacter jejuni*, que les souches utilisées pour l'infection de poulets pouvaient avoir un impact différent selon leurs modes de conservation avant essai. Pour cela, les auteurs ont comparé des souches « fraîches » avec des souches « adaptées ». Les souches « fraîches » provenaient soit de personnes atteintes d'une campylobactériose, soit isolées de poulets et stockées aussitôt à -80°C . Les souches « adaptées » étaient manipulées plusieurs fois au laboratoire avec divers cycles de congélation et de sub-cultures. Ces auteurs ont montré que les souches « fraîches » ont un potentiel de colonisation plus élevé et une variabilité inter-isolats plus importante indiquant que les essais sur volontaires devaient être interprétés avec précaution.

Une alternative aux expérimentations sur des sujets volontaires sains consiste à utiliser des modèles animaux. Cependant la variabilité existante dans le cadre de l'interaction hôte / pathogène rend souvent difficile la transposition des résultats de l'animal à l'humain. De plus, dans le cas des expérimentations sur animaux, il y a généralement peu de sujets par dose testée et les doses sont souvent très importantes pour assurer un bon niveau d'infection ou de morbidité (Holcomb, Smith *et al.* 1999; Buchanan, Smith *et al.* 2000). Enfin, les modalités d'étude du pathogène ou de sa toxine, injection ou étude sur cellules Véro, peuvent également se révéler importantes (Lindgren, Samuel *et al.* 1994).

6.2. Limites liées aux données d'épidémies

Les divers modèles mathématiques nécessitent d'être validés à partir de données provenant d'épidémies mieux documentées. Certains auteurs regrettent, par exemple, que peu d'informations utiles à l'évaluation de la relation dose-réponse soient collectées lors de

l'investigation d'épidémies. De cette manière, des facteurs relatifs au pathogène, à l'hôte et à l'aliment pourraient mieux être pris en compte. Il devient donc important de modifier les protocoles d'enquêtes épidémiologiques afin de recueillir ce type d'information complémentaire de celle actuellement collectée (Leclerc, 2000; Sanaa and Cerf, 2002). Par exemple, la quantité d'aliment ingérée par personne (Buchanan, Smith *et al.*, 2000; Nauta, Evers *et al.*, 2001) et l'impact éventuel de l'historique temps-température pour les aliments servis au repas et les aliments analysés (Leclerc, 2002) se révèlent intéressants à prendre en compte pour mieux estimer la dose ingérée.

De plus, les données provenant d'investigations d'épidémies ne sont pas toujours l'exacte représentation de la réalité et une sous-estimation du nombre de malades peut être à l'origine d'un biais important lors de la validation du modèle dose-réponse (Michel, Wilson *et al.*, 2000; Desenclos, Vaillant *et al.*, 2002).

Concernant l'évaluation de la dose ingérée, la valeur de dénombrement obtenue peut être de plus ou moins bonne qualité, voire très incertaine. Dans ce contexte, la représentativité de l'échantillon servant à réaliser le dénombrement est importante (reste de l'aliment ingéré, plat témoin, échantillons provenant du même lot que celui consommé ou d'un lot différent analysé plusieurs semaines après l'infection).

Le type et l'intensité du stress subi par le pathogène peuvent également être responsables d'une perte de cultivabilité lors de l'utilisation de milieux de culture sélectifs (sous-estimation du nombre de pathogènes réellement présents dans l'échantillon). Par exemple, les profils temps-température liés à une multiplication ou une perte de cultivabilité des pathogènes sont généralement mal appréciés (transformation, stockage) et donc peu pris en compte lors de l'étape de dénombrement.

La méthode de dénombrement utilisée joue également un rôle déterminant dans la qualité du résultat. La plus couramment utilisée dans le cadre de l'évaluation de la relation dose-réponse est celle du nombre le plus probable (NPP). Cette méthode est basée sur l'hypothèse - pas toujours réaliste - qu'une seule cellule (quel que soit son état physiologique) est capable de se multiplier puis d'être détectée lorsqu'elle est placée dans un bouillon d'enrichissement sélectif (pas nécessairement adapté à la cible spécifique du stress). Si l'on accepte cette hypothèse, cette méthode présente l'avantage d'obtenir une limite de détection faible. La représentativité et la précision du résultat peuvent être améliorées en augmentant la quantité d'aliment réellement testée, le nombre de dilutions ou le nombre de tubes par dilution. L'intervalle de confiance associé au dénombrement NPP devrait être pris en compte dans la construction de la relation dose-réponse.

Enfin, les hypothèses mises en œuvre pour combler le manque de données quantifiées (l'exposition, par exemple) et remonter ainsi à la dose ingérée, sont parfois entachées d'une grande incertitude. Celle-ci, lorsqu'elle n'est pas prise en compte, peut faire aboutir à la validation d'un modèle de manière inexacte. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de rappeler que la qualité des données collectées et l'exhaustivité des résultats obtenus est primordiale pour apprécier les limites liées à l'évaluation de la relation dose-réponse.

7- Conclusions

La synthèse des données bibliographiques nécessaires à l'établissement d'une relation dose-réponse pour *E. coli* O157:H7 a été réalisée ; les données provenant d'épidémies ou d'expériences dose-réponse chez l'homme ou l'animal, les modèles mathématiques utilisés et les données épidémiologiques permettant de déterminer la probabilité de développer un SHU suite à une infection par *E. coli* O157:H7 ont été analysées. Nous avons estimé que la probabilité de développer un syndrome hémolytique et urémique en cas de maladie allait de 8 à 12 % chez les enfants âgés de moins de 5 ans, et de 2 à 5% chez les enfants de plus de 5 ans. La probabilité de décès en cas de syndrome hémolytique et urémique a été estimée entre 0,5 et 1% pour l'ensemble des enfants âgés de moins de 16 ans.

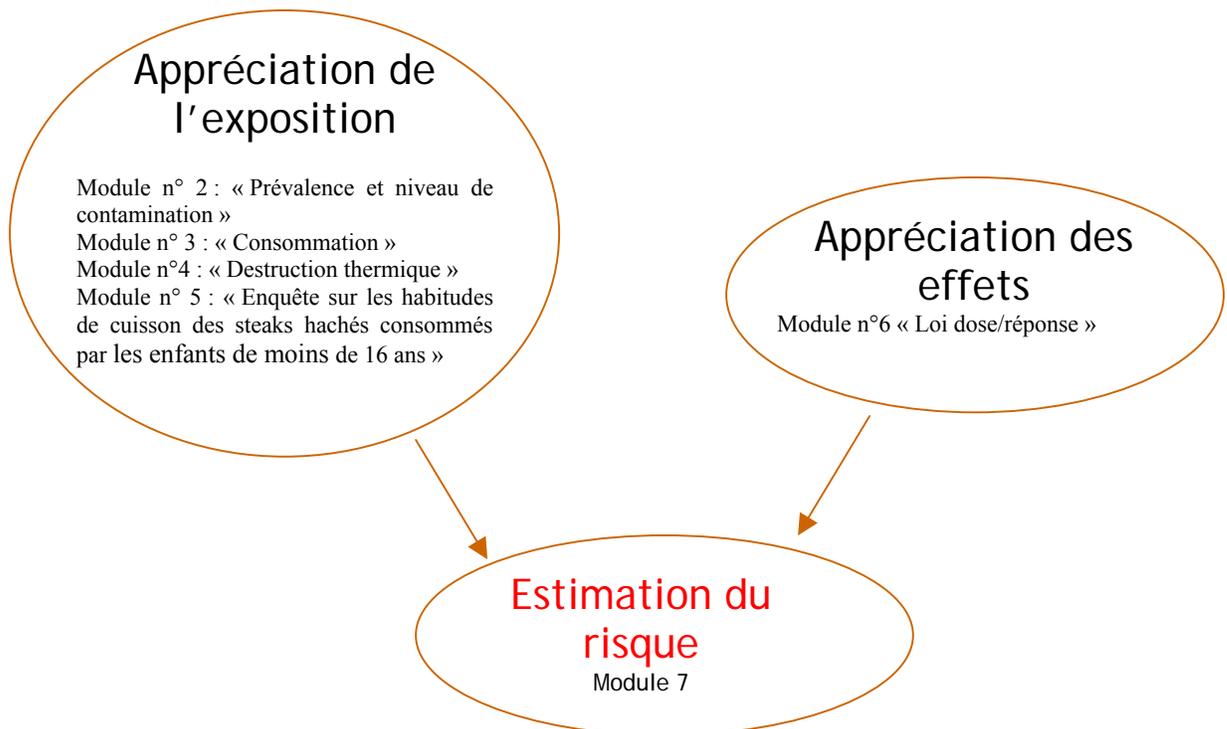
L'analyse bibliographique des types de modèles mathématiques mis en oeuvre, des hypothèses sous-jacentes associées, des données provenant d'infections expérimentales ou d'épidémies utilisées pour construire ou vérifier l'ajustement de ces modèles, a permis de souligner qu'aucun des modèles mathématiques jusque là utilisés pour l'évaluation de la relation dose-réponse pour *E. coli* O157:H7 n'était complètement satisfaisant pour être utilisé dans la modélisation des données françaises.

De plus, la comparaison des modèles et des données montre que les modèles basés sur les données EPEC/volontaires sains et O157:H7/lapins ne semblent pas pertinents pour la construction d'une loi dose réponse pour *E. coli* O157:H7, d'autant qu'ils sont non sécuritaires aux faibles doses. En revanche, les modèles construits sur les données *Shigella*/volontaires sains pourraient être intéressants. De même, les modèles construits sur des données d'épidémies (Teunis *et al.*, 2004, Strachan *et al.*, 2005) semblent coïncider relativement bien avec les données retenues, bien que nous ayons souligné leur construction peu solide (les modèles de Teunis n'étant fondés que sur une donnée chacun, le modèle de Strachan sur un ensemble d'épidémies dont certaines utilisent des données peu fiables).

Le modèle de Crockett construit sur les données *Shigella*/volontaires sains décrit la probabilité de maladie (Crockett *et al.*, 1996); le modèle de Teunis décrit la probabilité d'infection, qu'il est possible de transformer (grâce aux données de la publication) en utilisant une probabilité de maladie en cas d'infection de 55% (Teunis *et al.*, 2004). Le modèle de Strachan utilise la probabilité d'infection, mais les données provenant d'épidémies sur lesquelles il est ajusté sont majoritairement exprimées en terme de nombres de malades (Strachan *et al.*, 2005). De ce fait, nous avons choisi de considérer, pour notre modélisation, le modèle de Strachan comme décrivant la probabilité de maladie.

L'analyse critique de l'ensemble de données bibliographiques, couplée aux données obtenues lors de l'épidémie française survenue en octobre 2005, nous a donc permis de retenir les modèles les plus pertinents pour la construction d'une loi dose-réponse cohérente avec la situation observée en France : ont été retenus trois modèles du type bêta -Poisson, les modèles de Crockett, Teunis et Strachan. Les données obtenues lors de l'épidémie française de 2005 pourront être utilisées pour valider les modèles choisis, sachant que parmi les 17 cas de SHU déclarés, 10 concernaient des enfants de moins de 5 ans, 6 des enfants entre 5 et 9 ans et 1 était survenu chez un adulte. Ces modèles seront comparés dans l'étape d'estimation du risque, et la différence entre les modèles représentera notre incertitude de modélisation sur l'appréciation des effets.

Chapitre III : Estimation du risque



Module n°7 : Appréciation quantitative des risques

1- Introduction

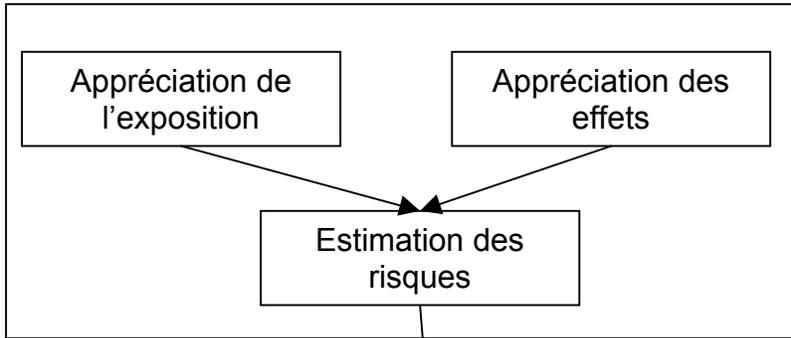
Notre objectif est dans cette partie de construire un modèle d'appréciation quantitative des risques (AQR) permettant de prévoir le risque pris par un consommateur lors de la consommation de steak haché surgelé en restauration familiale. Ce modèle est composé classiquement d'un **module d'appréciation de l'exposition**, d'un **module d'appréciation des effets** et d'un **module d'estimation des risques** qui utilise les sorties des deux modules précédents. L'effet modélisé est soit la maladie soit le syndrome hémolytique et urémique (SHU) qui est l'expression clinique grave chez les enfants de moins de quinze ans.

Notre démarche se divise en trois étapes successives qui ont été motivées au fil de notre travail par les résultats obtenus à la fin de chaque étape.

- 1) La première étape a consisté à bâtir un modèle à partir d'hypothèses relativement simples puis à l'alimenter avec les données disponibles pour tenter de simuler l'épidémie française de 2005. Cette première étape a été réalisée à l'aide de simulations de Monte Carlo à une dimension prenant en compte la seule variabilité des paramètres du modèle. Les résultats de ces simulations ont donné des résultats incohérents avec les données épidémiologiques recueillies lors de cette épidémie. Ces incohérences étaient liées en particulier à l'inadéquation du module appréciation des effets qui sous-estimaient la sensibilité aux pathogènes des enfants de moins de 10 ans. Nous avons alors décidé de revoir le module appréciation des effets à partir de ces données.
- 2) Dans une deuxième étape nous avons donc tenté d'estimer de nouvelles lois dose-réponse pour les enfants de moins de 10 ans. Cette étape a été réalisée par inférence bayésienne à partir des résultats des simulations obtenues en sortie du module d'appréciation de l'exposition et des nombres de cas de SHU observés lors de l'épidémie et de l'âge des malades concernés.
- 3) Enfin dans une dernière étape nous avons utilisé les résultats de l'étape 2 pour construire un nouveau modèle d'AQR complet constitué des modules d'appréciation de l'exposition et d'estimation des risques tels qu'ils étaient définis à l'étape 1 et d'un module d'appréciation des effets construit lors de l'étape 2. Ce modèle complet a été utilisé pour simuler par Monte Carlo à une dimension, divers scénarios, dans une optique d'aide à la gestion des risques.

Le schéma suivant résume ces trois étapes.

Etape 1



Simulations Monte Carlo

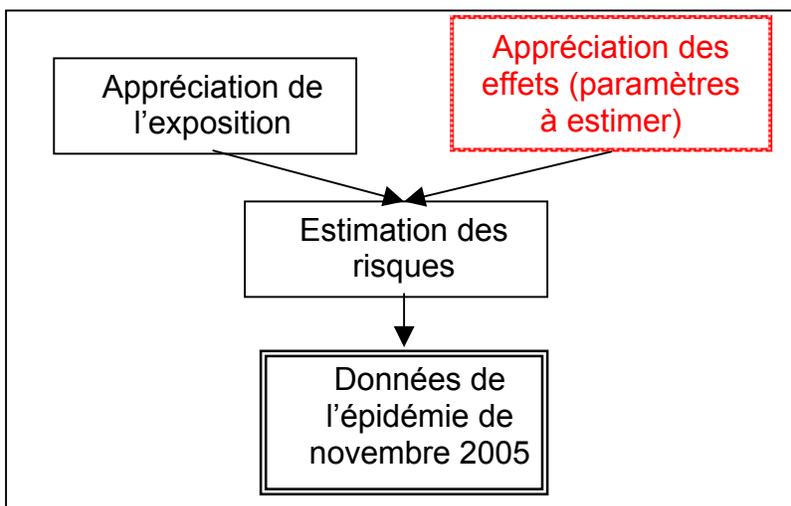
Risques estimés



confrontation
⇒ **incohérences**

Données de l'épidémie de novembre 2005

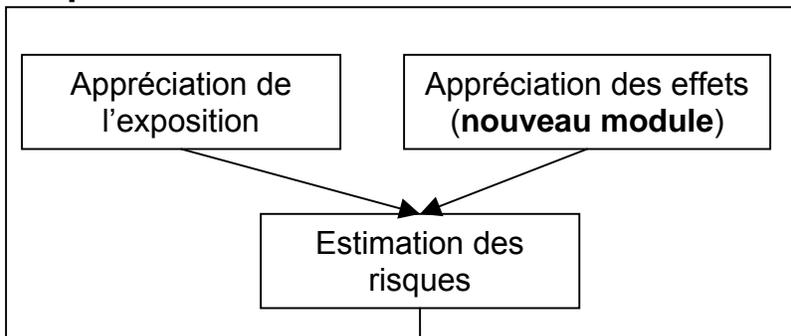
Etape 2



Inférence bayésienne

Paramètres des lois dose-réponse

Etape 3



Simulations Monte Carlo

Risques estimés pour divers scénarios

Figure 10 : Schéma de la démarche suivie

Certaines parties de ce module un peu technique apparaissent en caractères plus petits. La lecture de ces parties n'est pas indispensable au lecteur non spécialiste.

2- Etape 1 : construction d'un modèle d'AQR et confrontation aux données de l'épidémie française de 2005

2.1. Description générale des différents modules et des hypothèses du modèle

2.1.1. Appréciation de l'exposition

Le module d'appréciation de l'exposition est basé sur l'architecture décrite sur le schéma ci-dessous pour chacune des trois classes d'âge étudiées c'est-à-dire [0 – 5 ans[, [5 – 10 ans[et [10 – 16 ans[.

Module d'appréciation de l'exposition pour une classe d'âge

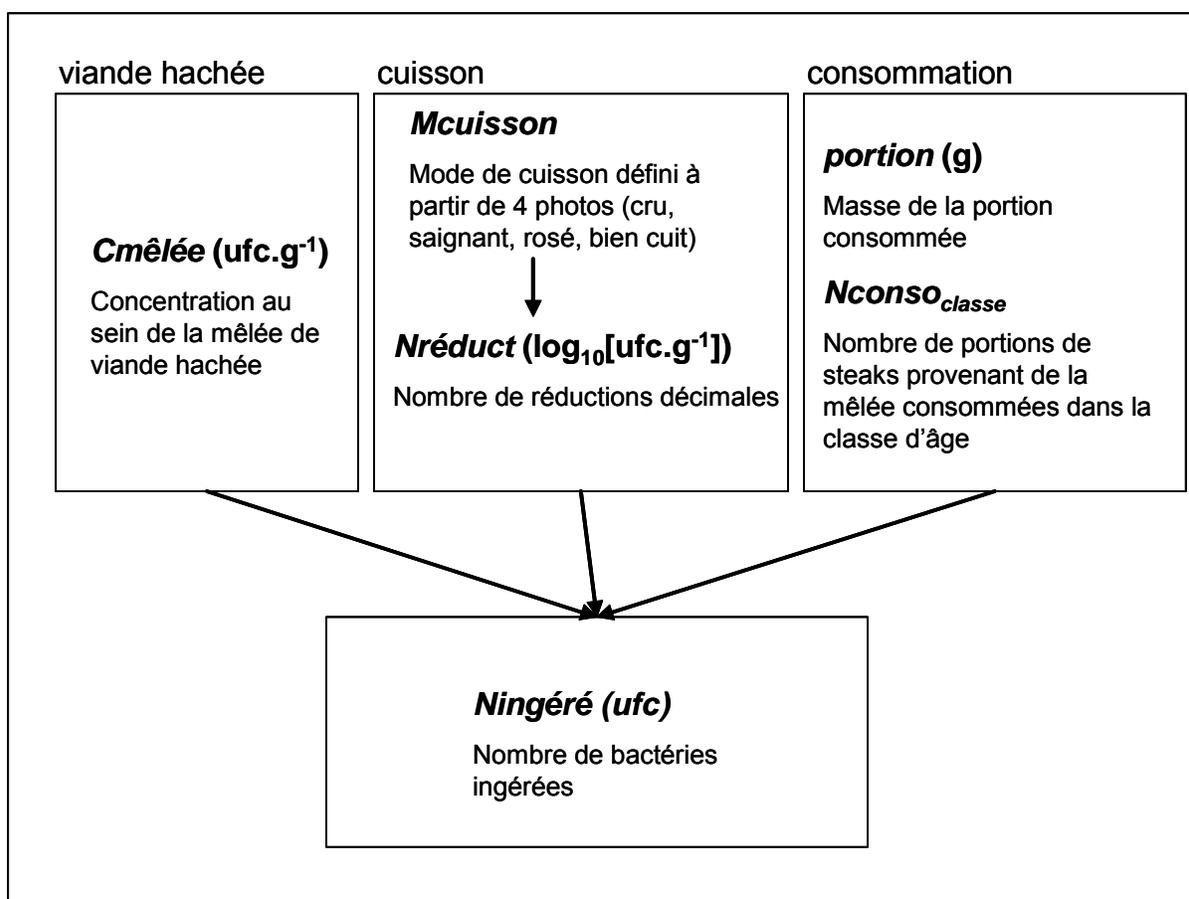


Figure 11 : Schéma décrivant les paramètres du module d'appréciation de l'exposition

La dose ingérée (*Ningéré* en ufc), c'est-à-dire le nombre de bactéries ingérées lors d'une prise alimentaire de steak haché, est supposée calculable à partir de la sortie de trois blocs caractérisant respectivement la contamination initiale de la viande hachée, la cuisson et la consommation. Les trois blocs sont supposés indépendants les uns des autres.

- La **concentration initiale moyenne du pathogène dans la mêlée** ($C_{mêlée}$ en ufc g^{-1}) est supposée constante dans le cadre de la simulation d'une épidémie à partir d'une seule mêlée. La distribution de la concentration au sein de la mêlée est supposée suivre une loi de Poisson d'après les résultats de la partie « prévalence et contamination » de ce rapport. Aucun effet de la surgélation n'est pris en compte dans ce modèle pour les raisons suivantes : d'une part il ne semble pas qu'une surgélation industrielle, donc rapide, puisse réduire notablement le niveau de contamination (Dykes, 2006), d'autre part les données de contamination de la mêlée incriminée lors de l'épidémie de 2005 correspondent à des dénombrements réalisés sur les steaks hachés après surgélation. Par ailleurs aucune croissance bactérienne avant cuisson n'est modélisée, en supposant qu'il n'y a pas de rupture de la chaîne du froid conséquente lors du stockage des steaks (passage de $-18^{\circ}C$ à plus de $+10^{\circ}C$) et que les steaks sont cuits sans décongélation préalable ou que l'impact de cette décongélation le cas échéant est négligeable.
- La cuisson est caractérisée par le **mode de cuisson** ($M_{cuisson}$) supposé contrôlé par le préparateur du steak, dépendant de la classe d'âge et variable dans chaque classe d'âge. Ce mode de cuisson est défini à partir des quatre photos présentées dans la partie « consommation » et peut donc prendre une des quatre modalités suivantes : « cru », « saignant », « rosé » ou « bien cuit ». Le **nombre de réductions décimales** ($N_{réduct}$) est dépendant du mode de cuisson et variable pour chaque mode de cuisson (cf. partie « destruction thermique »).
- La **portion** consommée ($portion$ en g) est supposée dépendante de la classe d'âge et variable au sein de chaque classe d'âge. Pour un nombre total de steaks hachés distribués dans la population (N_{conso}), le nombre de prises alimentaires dans chaque classe d'âge ($N_{conso_{classe}}$) est estimé à partir des données de consommation (cf. partie « consommation ») en supposant que le nombre total de steaks consommés par la population correspond au nombre total de prises alimentaires toutes classes d'âge confondues (en incluant les consommations des adultes).

A partir de ces paramètres, la distribution des doses ingérées est obtenue en simulant un très grand nombre de fois pour chaque classe d'âge une consommation de viande hachée de la mêlée considérée. Pour **chacune des consommations simulées dans chacune des classes d'âge**, on tire aléatoirement dans la loi des modes de cuisson de cette classe d'âge le **mode de cuisson** ($M_{cuisson}$). A partir de ce mode de cuisson, on tire aléatoirement dans la loi qui lui correspond un **nombre de réductions décimales** ($N_{réduct}$). On tire aléatoirement dans la loi décrivant les portions consommées dans cette classe d'âge une **portion** ($portion$). A partir de la **concentration initiale moyenne du pathogène dans la mêlée** ($C_{mêlée}$) qui est fixe on tire aléatoirement le **nombre de bactéries ingérées** ($N_{ingéré}$) dans la loi de Poisson de moyenne $\lambda = C_{mêlée} \times 10^{-N_{réduct}} \times portion$. La variable que nous notons dans ce module $N_{ingéré}$ correspond à la dose individuelle noté D_{ind} dans le module 6.

2.1.2. Appréciation des effets

L'étude bibliographique a conduit à sélectionner trois modèles décrivant soit le risque de maladie (modèle de Crockett (Crockett *et al.*, 1996)), soit le risque d'infection (modèle de Teunis (Teunis *et al.*, 2004)) (cf. module 6 « loi dose-réponse »), soit le risque d'un effet non strictement caractérisé (modèle de Strachan (Strachan *et al.*, 2005)). En effet, Strachan *et al.* (2005) présentent leur modèle comme décrivant le risque d'infection, mais les données provenant d'épidémies sur lesquelles est ajusté leur modèle sont majoritairement exprimées en terme de nombres de malades. C'est pourquoi nous avons considéré finalement ce modèle comme décrivant le risque de maladie.

Ces trois modèles sont tous du type bêta-Poisson, c'est-à-dire qu'ils décrivent le risque de l'effet associé à l'ingestion d'une bactérie par une loi bêta, mais ils ne décrivent pas tous le même effet (maladie ou infection). Rappelons que le modèle bêta-Poisson est défini au départ à partir du modèle exponentiel caractérisé par un seul paramètre r , le risque d'effet lié à l'ingestion d'une bactérie. Dans le modèle exponentiel, r est en effet supposé constant et le risque d'effet lié à l'ingestion de N bactéries est défini simplement comme la probabilité qu'une des bactéries ingérées au moins produise l'effet chez l'hôte, c'est-à-dire $P = 1 - (1 - r)^N$. Dans un modèle bêta-Poisson, le paramètre r n'est plus supposé constant mais variable d'un hôte à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre, suivant une loi bêta caractérisée par les paramètres α et β . Le modèle de Strachan est plus complexe que les deux autres du fait qu'il décrit pour une valeur de r donnée l'apparition de l'effet non pas par une loi binomiale de paramètre P mais par une loi bêta binomiale incluant un paramètre supplémentaire, θ . Plus précisément le nombre de cas est décrit par une loi binomiale de paramètre p avec p provenant de la loi bêta($P/\theta; (1-P)/\theta$). Le tableau suivant donne les trois modèles sélectionnés ainsi que leurs paramètres et l'effet qu'ils modélisent.

Tableau 12 : Description des modèles dose-réponse retenus

Modèle	Effet modélisé	Paramètres
Crockett	maladie	$\alpha = 0,162$ $\beta = 15,86$
Strachan	maladie (majoritairement)	$\alpha = 0,0565$ $\beta = 2,5487$ $\theta = 0,3758$
Teunis	infection (avec une proportion de 55% de malades parmi les infectés)	$\alpha = 0,084$ $\beta = 1,44$

La figure suivante (n°12) représente la distribution du logarithme décimal du risque de maladie associé à l'ingestion d'une bactérie pour chacun des trois modèles. Elle rend donc compte de la variabilité de la valeur de r associée à l'ingestion d'une seule bactérie. On s'aperçoit que bien que les paramètres α et β des lois bêta soient assez différents entre les trois modèles, les distributions de variabilité de r obtenues pour les trois modèles sont assez proches, notamment en ce qui concerne leur tendance centrale.

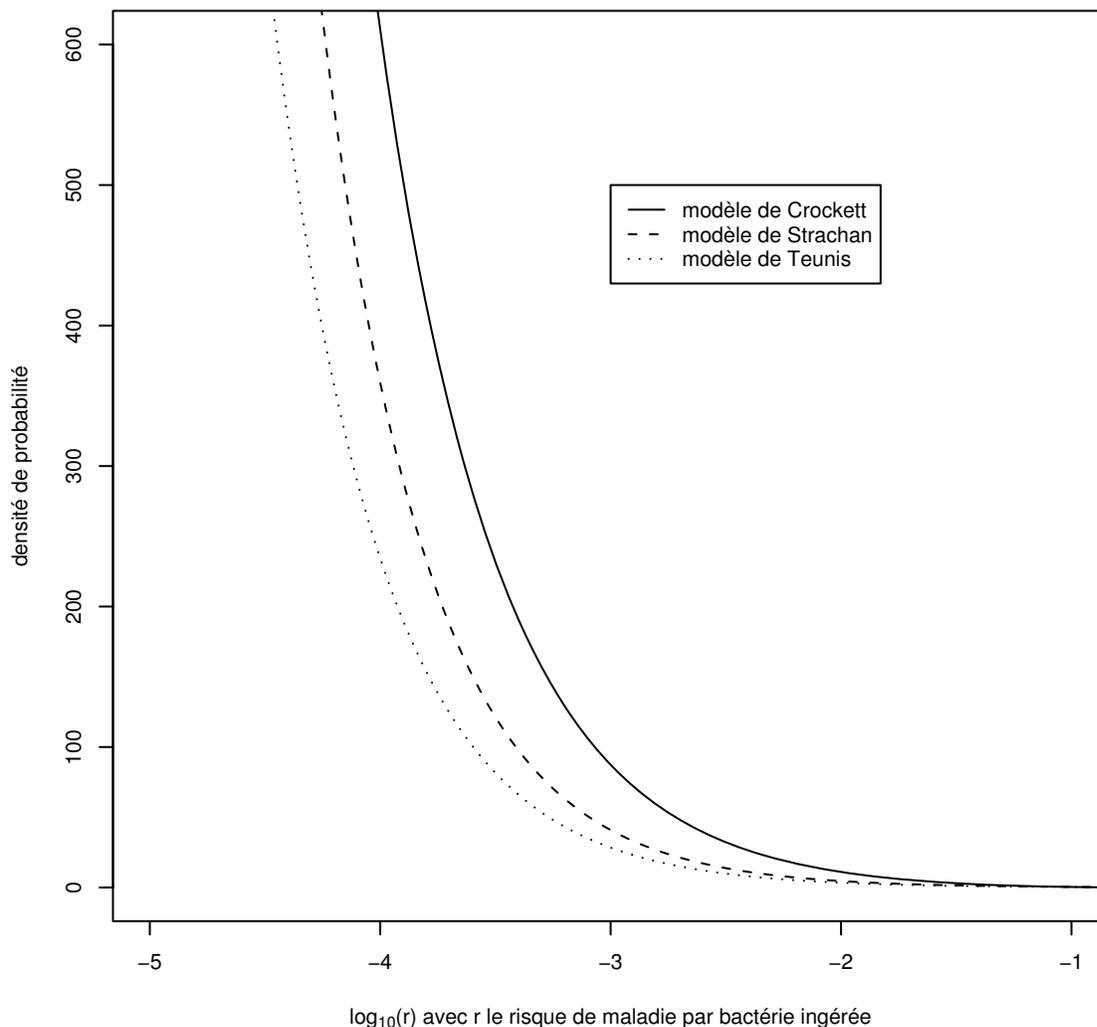


Figure 12 : Distribution du risque de maladie (en logarithme décimal) associé à l’ingestion d’une bactérie pour chacun des trois modèles dose-réponse retenus

Pour le modèle de Teunis, le risque de maladie a été calculé en multipliant le risque d’infection par 0,55, Teunis et al. (2004) rapportant une proportion de 55% de malades parmi les infectés. Par ailleurs, le risque de développer un syndrome hémolytique et urémique (SHU) en cas de maladie a été estimée entre 8 et 12% chez les enfants moins de 5 ans, et entre 2 et 5% chez les enfants de plus de 5 ans (cf. partie « loi dose-réponse »).

2.1.3. Estimation des risques

Les modèles dose-réponse de type bêta-Poisson sont très souvent utilisés pour estimer un risque à partir d’une estimation d’une dose moyenne ingérée, en utilisant la formule approchée rappelée dans la partie « dose réponse » de ce rapport. Dans le cadre de notre modèle, nous n’avons pas estimé de dose moyenne mais bien des doses individuelles en prenant en compte diverses sources de variabilité entre les consommations, liées en particulier au mode de cuisson, à la portion ingérée et à l’âge du consommateur. Ainsi nous avons simulé des consommations individuelles, et pour chaque consommation un nombre de bactéries ingérées *Ningéré*. A partir de cette dose (*Ningéré*) et suivant le modèle dose-réponse choisi le **risque d’effet néfaste (infection, maladie ou SHU)** peut être calculé en tirant aléatoirement une valeur du paramètre *r* dans la loi bêta-Poisson définissant le modèle dose-réponse choisi et en calculant $P = 1 - (1 - r)^{Ningéré}$ pour les modèles de Crockett et de Teunis ou en tirant aléatoirement dans la loi bêta($(P/\theta; (1 - P)/\theta)$) pour le modèle de Strachan. L’état du consommateur (malade ou non) peut être simulé à partir de ce risque en faisant un tirage de Bernoulli (échantillon unitaire tiré d’une loi binomiale) à partir de ce risque.

2.2. Données disponibles

2.2.1. Niveau de contamination

Lors de l'épidémie française de 2005, tous les cas de syndrome hémolytique et urémique identifiés ont été attribués à la consommation de steak haché surgelé provenant de la première mûlée de la journée correspondant au sous-lot marqué 2319001. Les résultats de détection et de dénombrement du pathogène sur 22 steaks de cette mûlée ont permis de modéliser la répartition de la contamination dans la mûlée par une loi de Poisson avec une concentration moyenne $C_{mûlée} = 5,9 \text{ ufc.g}^{-1}$ (cf. module 2 « prévalence et niveau de contamination »). Les dénombrements ayant été effectués sur des steaks surgelés, ils sont supposés refléter l'état de la contamination juste avant cuisson.

2.2.2. Destruction thermique

Pour chaque consommation, la destruction thermique du pathogène au cours de la cuisson peut être estimée d'une part à partir des résultats de l'enquête « mode de cuisson » (cf. rapport correspondant) d'autre part à partir des résultats des essais de cuisson réalisés au Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agro-alimentaires de l'Afssa (cf. module 5 « destruction thermique »).

Tableau 13 : Distribution des modes de cuisson pour chaque classe d'âge

Les distributions des modes de cuisson utilisées pour chaque classe d'âge sont les suivantes :

Paramètre <i>M</i> cuisson	cru	saignant	rosé	bien cuit
Classe d'âge				
[0 - 5 ans[0%	9,7%	41,0%	49,3%
[5 - 10 ans[0,8%	16,6%	54,0%	28,6%
[10 - 16 ans[1,1%	19,9%	54,6%	24,4%

Pour chaque mode de cuisson, le niveau de destruction thermique exprimé en nombre de réductions décimales a été modélisé par une loi uniforme dont les paramètres sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Tableau 14 : Distribution du nombre de réductions décimales pour chaque mode de cuisson

Paramètre <i>M</i> cuisson	cru	saignant	rosé	bien cuit
Loi du paramètre <i>N</i> réduct	Unif(0 ; 0)	Unif(0 ; 0,9)	Unif(0,2 ; 1,4)	Unif(1,2 ; 2,8)

2.2.3. Consommation

D'après les données fournies par la société qui avait fabriqué les steaks hachés, 2604 unités de consommation (steaks de 100g) sous-lot marqué 2319001 auraient été mises sur le marché. Parmi celles-ci, 449 ont été retirées ou rappelées. Au final on peut donc considérer qu'au plus 2155 unités de 100 g de ce sous lot incriminé auraient été consommées. On a considéré que

toutes ces unités ont été réellement consommés et l'on a donc fixé le nombre total de prises alimentaires dans la population *Nconso* à 2155. Afin d'estimer le nombre de consommations de produits de cette méele dans chacune des classes d'âge, nous pouvons utiliser les différentes données provenant des enquêtes de consommation. A partir de ces données la répartition estimée des nombres de prises dans les différentes classes d'âge est de 7,40% par les moins de 5 ans, 9,05% par les [5-10 ans[9,08% par les [10-16 ans[et 74,47% par les plus de 16 ans. D'après la répartition observée des prises alimentaires dans les classes d'âge, les **nombres de consommations par classe d'âge** ont été ainsi estimés:

- $Nconso_{[0-5[} = 0,0740 * Nconso = 159$
- $Nconso_{[5-10[} = 0,0905 * Nconso = 195$
- $Nconso_{[10-16[} = 0,0908 * Nconso = 196$
- $Nconso_{[16 \text{ et plus}] = 0,7447 * Nconso = 1605$

Par ailleurs la distribution des portions consommées dans chaque classe d'âge peut aussi être estimée à partir des données provenant de ces mêmes enquêtes (cf. partie « consommation »). Les distributions des portions utilisées pour chaque classe d'âge sont les suivantes :

Tableau 15 : distribution des portions ingérées pour chaque classe d'âge (cf. module 3 « consommation »)

Paramètre <i>portion</i> (g)]0 - 50]]50 - 100]]100 - 150]]150 - 200]]200 - 250]]250 - 300]]300 - 350]]350 - 400]
Classe d'âge								
[0 - 5 ans[54,1%	39,5%	6,4%	0%	0%	0%	0%	0%
[5 - 10 ans[15,6%	35,9%	45,5%	2,6%	0 %	0,4%	0%	0%
[10 - 16 ans[6,7%	24,9%	52,9%	12,2%	2,7%	0,3%	0%	0,3%

2.2.4. Nombre de cas de SHU lors de l'épidémie de 2005

En ce qui concerne l'épidémie française de 2005, nous pouvons considérer comme connu le nombre exhaustif de cas de SHU, compte tenu de la gravité clinique, mais pas celui des malades car en fonction de la symptomatologie certains malades n'ont pas consulté de médecins et n'ont donc pas été répertoriés. Dix-sept cas de SHU ont été identifiés : 10 chez des enfants de moins de 5 ans, 6 chez des enfants entre 5 et 9 ans et un chez un adulte.

2.3. Méthode de simulation

Comme cela a été précisé précédemment, il a été choisi dans cette étude de réaliser des simulations de type Monte Carlo à une seule dimension, sans prendre en compte la dimension d'incertitude. Chaque paramètre du modèle a donc été décrit par une distribution rendant compte de sa variabilité. Lors de chaque simulation les paramètres ont été tirés aléatoirement dans les distributions précédemment décrites. Les simulations en grand nombre ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 2.3.1) (Ihaka et Gentleman, 1996).

2.3.1. Simulations de l'appréciation de l'exposition

La distribution des doses ingérées (paramètre *Ningéré*) a été obtenue pour chaque classe d'âge à partir de 100 000 simulations du modèle d'exposition.

2.3.2. Simulations de l'estimation des risques

Le nombre de consommation de steaks hachés par des enfants de moins de 16 ans lors de l'épidémie a été estimé à 588 (146 chez les enfants de [0 - 5 ans[, 150 chez les enfants de [5 - 10 ans[et 292 chez les enfants de [10 - 16 ans[). Ce nombre de consommations n'étant pas très élevé, il n'est pas possible d'obtenir une estimation fiable du nombre de malades à partir d'une simulation unique de toutes les consommations de l'épidémie. La simulation de l'épidémie a donc été réalisée de la façon suivante : simulation un grand nombre de fois (10000) de la

consommation des 588 unités consommées lors de l'épidémie. Lors de chaque simulation de l'épidémie, un nombre de malades a été calculé par classe d'âge. On a donc obtenu au final 10 000 estimations du nombre de malades pour chaque classe d'âge.

2.4. Résultats des simulations obtenues à partir du modèle pour l'épidémie française de 2005

2.4.1. Appréciation de l'exposition

Les distributions de la dose ingérée obtenues pour chaque classe au moyen de 100 000 simulations sont représentées dans la figure et le tableau ci-dessous. Etant données les proportions non négligeables de doses très faibles (0, 1 ou 2 cellules), les distributions ont été représentées sur la figure en logarithme base 2 avec le \log_2 des doses nulles fixé arbitrairement à -1. On peut constater que la plupart des portions restent contaminées même après cuisson, respectivement 87%, 96% et 98% des portions pour les classes d'âge [0 – 5 ans[, [5 – 10 ans[et [10 – 16 ans[. Les doses ingérées simulées ne dépassent jamais quelques milliers de cellules. La répartition des doses diffère assez peu entre les classes d'âge [5 – 10 ans[et [10 – 16 ans[, avec des doses médianes respectives de l'ordre de 50 et 80 cellules pour les 2 classes. La répartition des doses ingérées par les moins de 5 ans est d'étendue aussi grande mais avec une plus forte proportion de doses faibles, avec une dose médiane de l'ordre de 10 cellules.

Tableau 16 : Distribution en fréquences pour chaque classe d'âge des doses ingérées simulées.

Nombre de bactéries ingérées Classe d'âge	0	1	2]2 – 4]]4 – 8]]8 – 16]]16 – 32]
[0 - 5 ans[12,8%	9,0%	6,3%	8,4%	9,9%	11,2%	12,2%
[5 – 10 ans[3,6%	3,8%	3,2%	4,8%	5,6%	7,2%	11,2%
[10 – 16 ans[2,0%	2,6%	2,4%	3,7%	4,6%	5,5%	9,0%

]32 – 64]]64 – 128]]128 – 256]]256 – 512]]512 – 1024]]1024 – 2048]]2048 – 4096]
10,7%	9,9%	7,0%	2,5%	0,2%	0,0%	0,0%
15,0%	16,2%	16,3%	10,8%	2,3%	0,0%	0,0%
14,7%	17,0%	18,8%	14,8%	4,6%	0,2%	0,0%

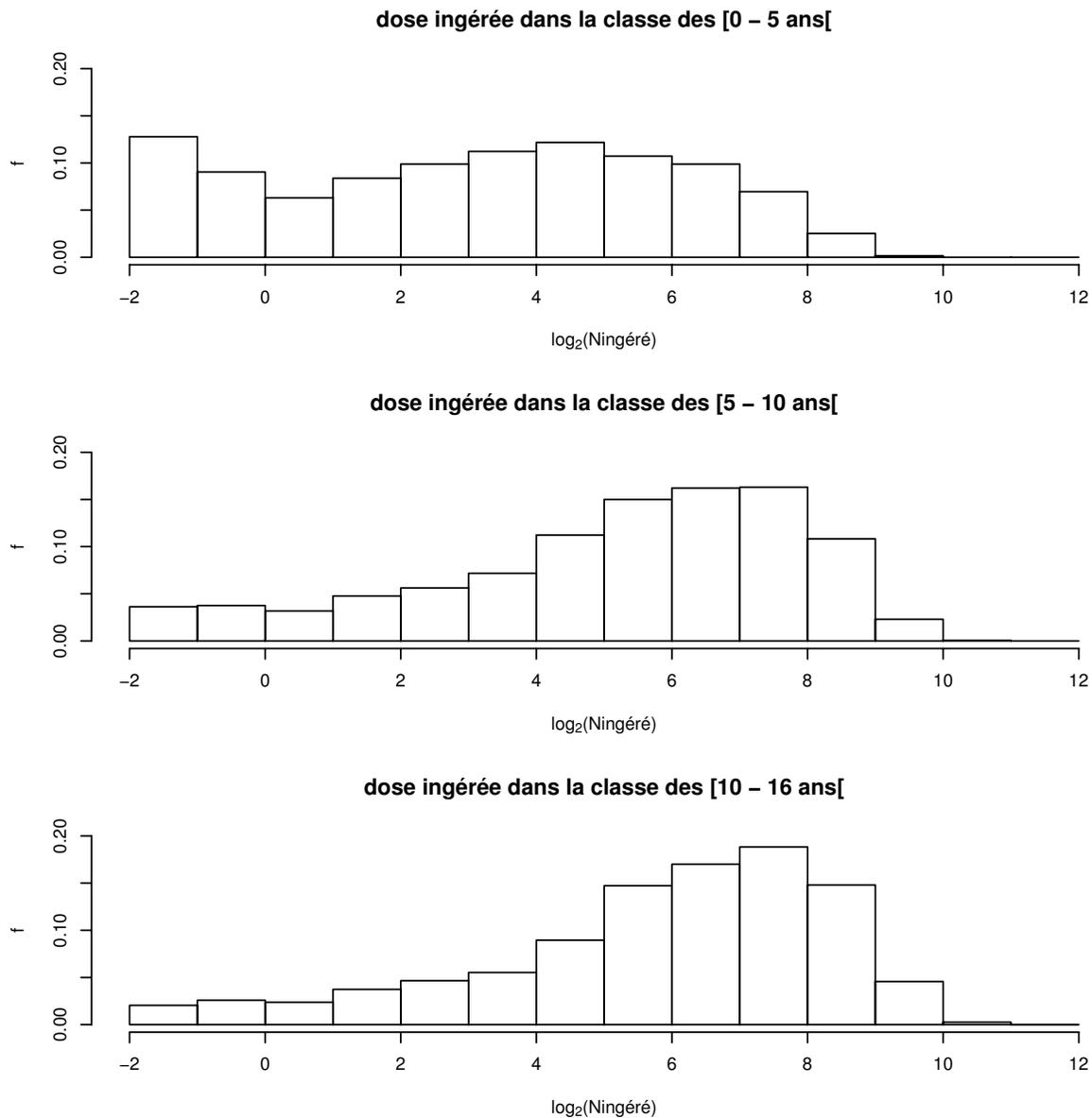


Figure 13 : Distribution en fréquences pour chaque classe d’âge des doses ingérées simulées, en logarithme base 2 avec le Log₂ des doses nulles fixé arbitrairement à -1 pour rendre possible la représentation graphique

2.4.2. Estimation des risques

Les tableaux suivants donnent les résultats calculés pour chaque classe d’âge pour 10 000 simulations de l’épidémie française de 2005, avec les trois modèles dose-réponse retenus, en termes de nombres de malades simulés (valeur médiane et quantiles à 2,5 et 97,5%) pour chaque classe d’âge. Rappelons que ces quantiles sont ici les quantiles de la distribution du nombre de malades liée à toutes les sources de variabilité prises en compte dans le modèle, et que l’incertitude n’a pas été modélisée (il s’agit de simulation de Monte Carlo à une dimension). Ainsi, il existe une variabilité sur le nombre de malades simulé parce que le nombre de consommations simulé par classe d’âge pour modéliser l’épidémie n’est pas très grand. Rappelons qu’on a fixé le nombre total de consommations de steak haché par les enfants de moins de 16 ans à 588 pour simuler cette épidémie.

Tableau 17 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de malades dans la classe d'âge [0 – 5 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 159 prises alimentaires dans cette classe d'âge

Modèle	Médiane du nombre de malades	Quantile à 2,5% du nombre de malades	Quantile à 97,5% du nombre de malades
Crockett	19	11	27
Strachan	16	9	24
Teunis avec Pr(maladie/infection)=0,55	15	9	23

Tableau 18 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de malades dans la classe d'âge [5 – 10 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 195 prises alimentaires dans cette classe d'âge

Modèle	Médiane du nombre de malades	Quantile à 2,5% du nombre de malades	Quantile à 97,5% du nombre de malades
Crockett	41	30	52
Strachan	30	21	40
Teunis avec Pr(maladie/infection)=0,55	28	18	38

Tableau 19 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de malades dans la classe d'âge [10 – 16 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 196 prises alimentaires dans cette classe d'âge

Modèle	Médiane du nombre de malades	Quantile à 2,5% du nombre de malades	Quantile à 97,5% du nombre de malades
Crockett	47	36	59
Strachan	34	24	44
Teunis avec Pr(maladie/infection)=0,55	30	21	40

Les trois modèles dose-réponse retenus donnent des estimations des nombres de malades dans chaque classe du même ordre de grandeur, avec une valeur médiane entre 16 et 19 dans la classe [0 – 5 ans[, entre 28 et 41 dans la classe [5 - 10 ans[et entre 30 et 47 dans la classe [10-16 ans[. D'après les données de la littérature, la probabilité de développer un SHU en cas de maladie se situerait entre 8 et 12% chez les enfants de moins de 5 ans et entre 2 et 5 % chez les enfants de plus de 5 ans (cf. partie dose-réponse). En supposant que 12% des enfants de moins de 5 ans malades développent un SHU, on arrive à partir de nos simulations à une estimation la plus probable du nombre de cas de SHU de 2 dans cette classe. Or rappelons que lors de l'épidémie française de 2005, 10 cas de SHU ont été répertoriés chez les moins de 5 ans. En ce qui concerne la classe [5 – 10 ans[, en supposant que 5% des malades de cette classe d'âge développent un SHU on arrive à partir de nos simulations à une estimation la plus probable du nombre de cas de SHU entre 1 et 2 dans cette classe. Or 6 cas ont été répertoriés lors de l'épidémie dans cette classe d'âge. Enfin, si l'on suppose que seulement 2% des malades de plus de 10 ans développent un SHU, on arrive à partir de nos simulations à une estimation la

plus probable du nombre de cas de SHU entre 0 et 1. Lors de l'épidémie, aucun cas n'a été répertorié chez les enfants de plus de 10 ans.

Si le modèle peut paraître acceptable pour les enfants de plus de 10 ans, il ne l'est pas sur les moins de 10 ans et ceci est difficilement admissible car notre modèle sous-estime vraisemblablement le nombre de malades chez les jeunes enfants et est donc peu sécuritaire. Cet écart aux données pour cette classe d'âge pourrait être expliqué par une inadéquation des trois modèles dose-réponse utilisés. De par leur forme commune à l'ensemble des classes d'âge, ils ne peuvent rendre compte d'une sensibilité plus grande au pathogène des très jeunes enfants mise en évidence lors de l'épidémie française de 2005, mais aussi apparaissant dans les données de surveillance de l'Institut de veille sanitaire (Espié *et al.*, 2003). Il semble que les trois modèles dose-réponse retenus sous-estiment la sensibilité des très jeunes enfants au pathogène. Ceci est sans doute lié au fait que ces modèles ont été établis à partir de données concernant des épidémies impliquant des enfants souvent plus grands ou des adultes. Le seul de ces modèles établi spécifiquement chez les enfants (modèle de Teunis) a été ajusté à partir de données concernant des enfants scolarisés à l'école primaire donc d'âge supérieur à 6 ans.

3- Etape 2 : établissement de lois dose-réponse chez enfants de moins de 10 ans à partir des données de l'épidémie de 2005

3.1. Description de la démarche et des modèles

3.1.1. La démarche

Suite au constat d'une inadéquation des modèles dose-réponse utilisés pour les classes d'âge [0-5 ans] et [5-10 ans], nous avons tenté d'estimer pour chacune de ces classes d'âge une loi dose-réponse plus réaliste. Pour cela, une approche bayésienne a été envisagée, basée sur les résultats de l'appréciation de l'exposition d'une part et sur les nombres de SHU observés dans ces classes d'âge d'autre part. Rappelons que seuls les nombres de SHU sont connus de façon exhaustive dans le cadre de l'épidémie de 2005. Une approche du même type avait été utilisée sur les données de l'épidémie japonaise de septembre 1996 pour estimer les paramètres du modèle de Teunis que nous avons utilisé auparavant (Teunis *et al.*, 2004). Néanmoins l'approche de Teunis *et al.* était nettement plus simple que la nôtre du fait qu'il considérait dans l'appréciation de l'exposition relative à l'épidémie que la taille des portions était la même pour tous les convives et l'aliment incriminé n'avait subi aucune cuisson. Dans l'épidémie de 2005, nous savons que les tailles des portions sont variables ainsi que les modes de cuisson des steaks. Plutôt que de raisonner sur une dose ingérée moyenne, nous avons donc pris comme information sur la dose pour chacune des deux classes d'âge, la distribution des doses ingérées simulées dans le cadre de l'appréciation de l'exposition présentée auparavant. Un second point différencie notre approche de celle de Teunis *et al.* (2004), c'est le fait que nous disposons sans doute de l'exhaustivité des cas de SHU relatifs à l'épidémie mais pas du tout des malades et encore moins des personnes infectées par le pathogène. Nous avons donc modélisé directement la relation entre la dose ingérée et la probabilité de développer un SHU.

3.1.2. Les trois modèles utilisés

En ce qui concerne le choix de la forme du modèle dose-réponse, nous avons testé trois modèles pour décrire le risque de SHU en fonction de la dose ingérée : un modèle exponentiel, un modèle exponentielle-Poisson et un modèle bêta-Poisson. Ces trois modèles sont basés sur le paramètre r , correspondant au risque d'effet lié à l'ingestion d'une bactérie et décrivent le risque d'effet lié à l'ingestion de N bactéries comme la probabilité qu'une des bactéries ingérées au moins produise l'effet chez l'hôte, c'est-à-dire $P = 1 - (1 - r)^N$. Si cette forme de modèle n'a de justification mécaniste que si l'effet considéré est l'infection, il n'y a pas d'argument fort qui s'oppose à son utilisation lorsque l'effet est la maladie (Teunis *et al.*, 1999) et ceci a d'ailleurs été fait couramment y compris dans les modèles présentés auparavant (modèles de Crockett et de Strachan). Ici nous appellerons donc r le risque de SHU lié à l'ingestion d'une bactérie. En ce qui concerne le pathogène *Escherichia coli* O157:H7, les auteurs utilisent préférentiellement un modèle bêta-Poisson dans lequel le paramètre r n'est pas supposé constant mais variable d'un hôte à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre, suivant une loi bêta caractérisée par les paramètres α et β . Néanmoins l'estimation de ces deux paramètres à partir de données peu nombreuses pose souvent quelques problèmes d'autant que ces paramètres sont structurellement très corrélés dans le modèle. Ce problème a été évoqué notamment par Teunis *et al.* (2004) et explique le fait que des lois dose-réponse qui

semblent assez proches peuvent avoir des valeurs de paramètres α et β assez différentes (cf. modèles de Strachan et de Crockett sur le tableau 10 du module 6).

Dans le cadre de notre étude, nous pourrions justifier l'utilisation du premier modèle, le modèle exponentiel qui suppose le paramètre r constant, par le fait que dans le cadre de l'épidémie une seule souche bactérienne est impliquée et que la variabilité inter-hôtes est réduite par le fait que nous estimons une loi dose-réponse par classe d'âge et que l'âge est certainement un des facteurs influençant le plus la sensibilité au pathogène.

Par ailleurs, nous proposons un deuxième modèle, qui décrit une variabilité inter-hôtes du paramètre r non pas par une loi bêta mais par une loi exponentielle caractérisée par un seul paramètre, en l'occurrence la valeur moyenne de r notée r_{moy} . Par analogie avec le modèle bêta-Poisson, nous appellerons ce modèle le modèle exponentielle-Poisson.

Le troisième modèle utilisé, le modèle bêta-Poisson, correspond à un modèle plus classique dans lequel la variabilité inter-hôtes du paramètre r est décrite par une loi bêta caractérisée par deux paramètres.

Les trois figures suivantes présentent les graphes des modèles bayésiens utilisés pour chacune des classes d'âge suivant la forme du modèle dose-réponse utilisé. Une loi *a priori* informative a été spécifiée sur le risque moyen de SHU associé à l'ingestion d'une bactérie, formulée sur la valeur de r pour le modèle dose-réponse exponentiel, sur la valeur de r_{moy} pour le modèle exponentielle-poisson et sur la valeur de $\alpha/(\alpha + \beta)$ pour le modèle bêta-Poisson (c'est-à-dire la moyenne de la loi bêta). En prenant en compte les trois moyennes des lois bêta des modèles de Crockett, Strachan et Teunis (resp. 0,010, 0,022 et 0,055), pour le modèle de Teunis, le risque rapporté de maladie en cas d'infection (0,55) et en considérant que le risque de SHU en cas de maladie se situe entre 0,02 et 0,30 (cf. données de la littérature reportées dans la partie « loi dose-réponse »), nous avons déduit comme *a priori* sur le logarithme décimal du risque moyen de SHU par bactérie ingérée une loi uniforme entre -4 et -2. En ce qui concerne le modèle bêta-Poisson, il a été reparamétré en $u = \alpha/(\alpha + \beta)$ et $v = \ln(\alpha + \beta)$ comme préconisé par Teunis *et al.* (2004) afin de réduire les problèmes de sur-paramétrage du modèle bêta-Poisson et de pouvoir spécifier la loi *a priori* informative décrite précédemment sur $\alpha/(\alpha + \beta)$. Une information *a priori* assez large (loi uniforme entre -10 et 10) a été spécifiée sur le paramètre v .

Les 3 graphiques ci-dessous (figures 14, 15 et 16) présentent le modèle décrivant le nombre de SHU dans une classe d'âge à partir des 3 modèles utilisés.

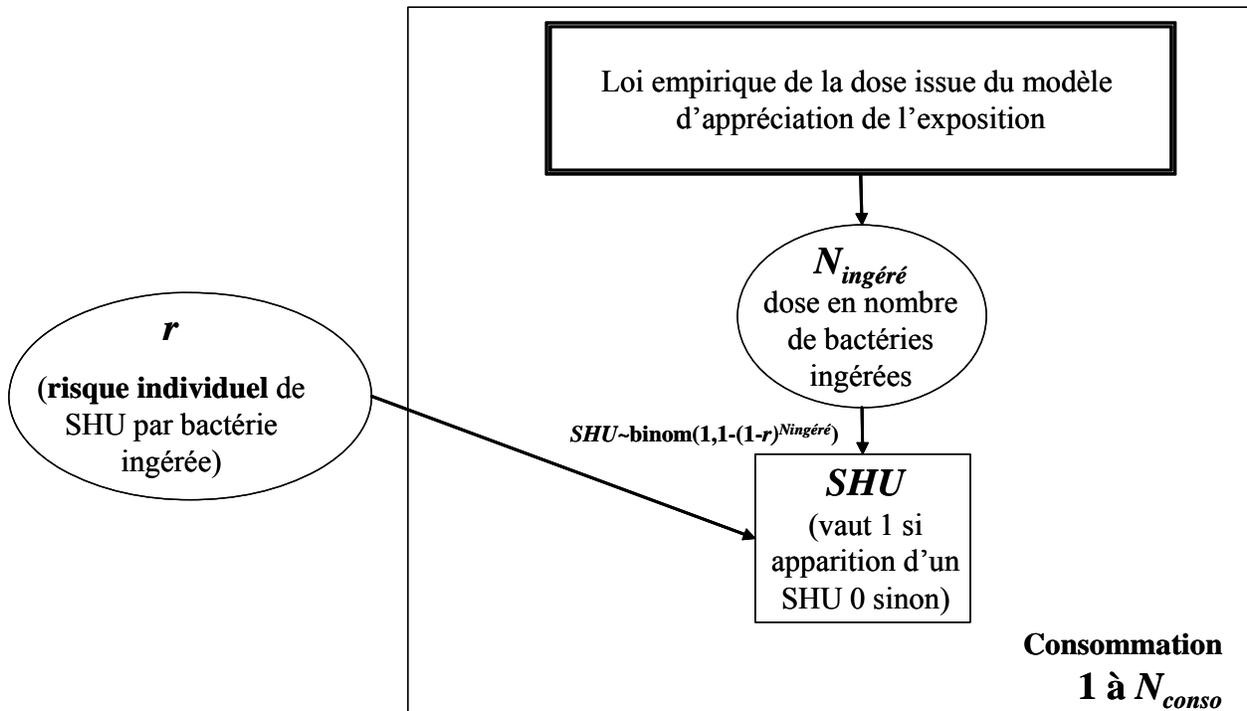


Figure 14 : Graphe du modèle décrivant le nombre de SHU dans une classe d'âge à partir d'un modèle dose-réponse exponentiel

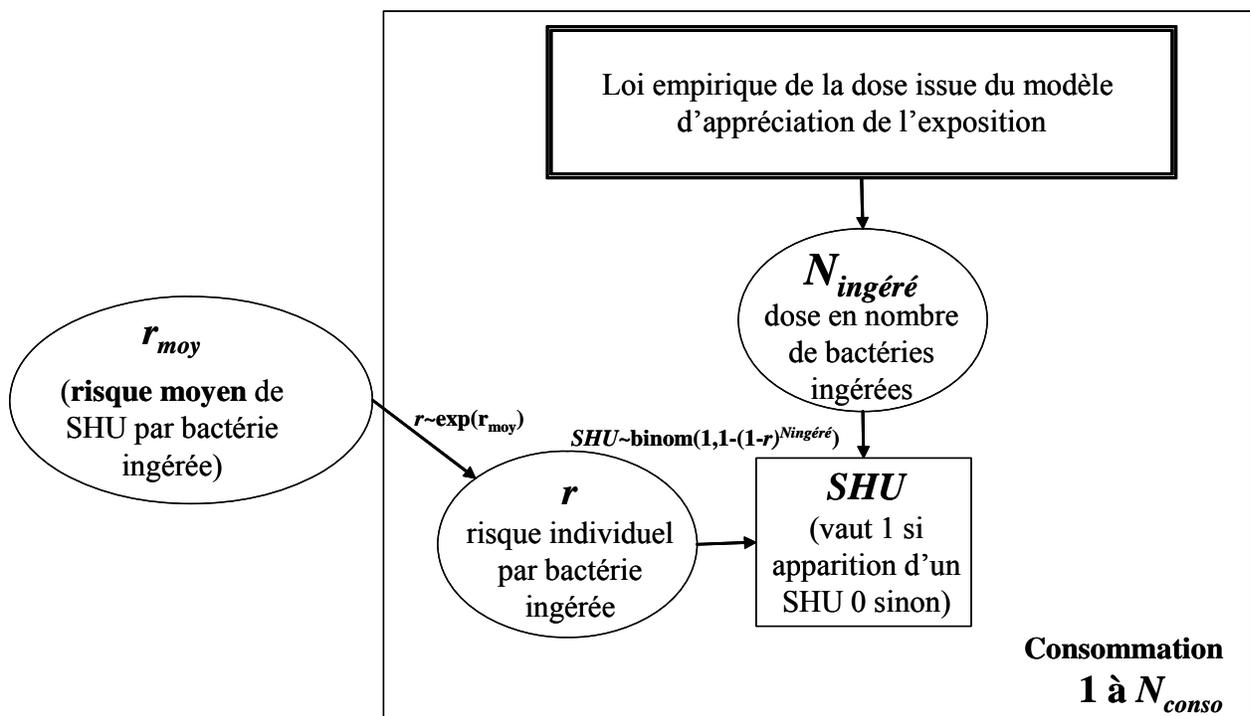


Figure 15 : Graphe du modèle décrivant le nombre de SHU dans une classe d'âge à partir d'un modèle dose-réponse exponentielle-Poisson

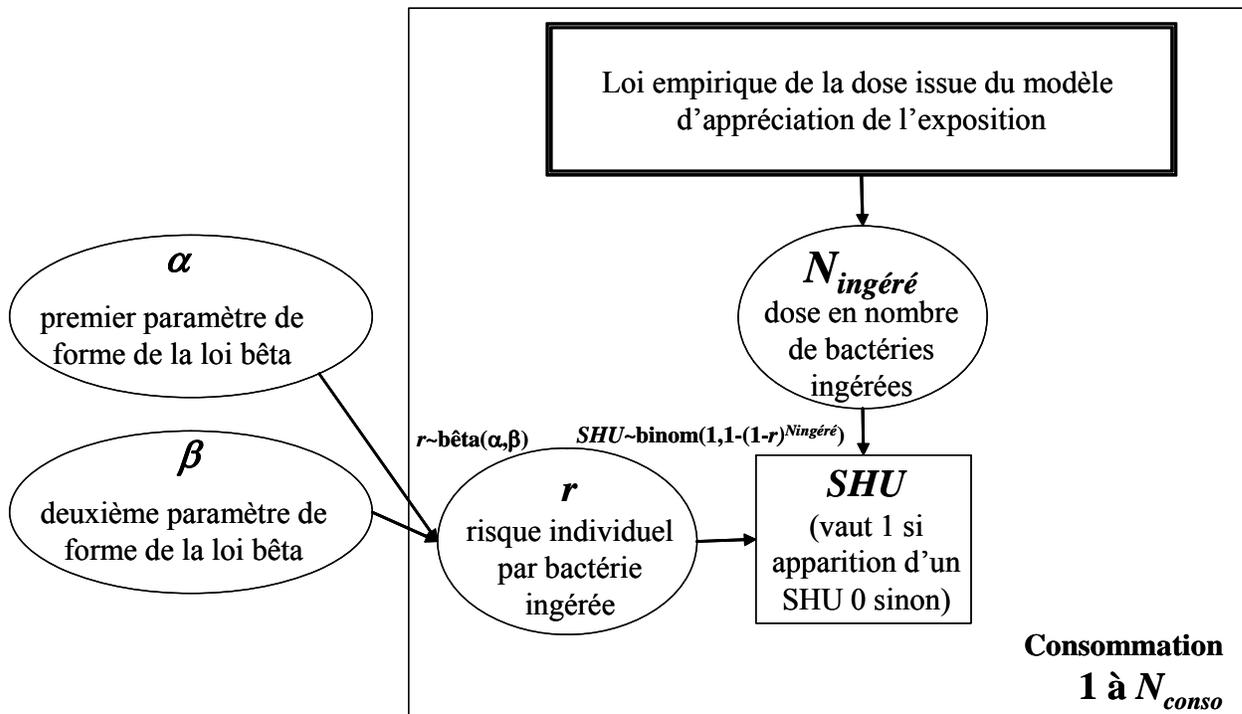


Figure 16 : Graphe du modèle décrivant le nombre de SHU dans une classe d'âge à partir d'un modèle dose-réponse bêta-Poisson

3.1.3. La méthode d'inférence bayésienne

L'inférence bayésienne (Carlin et Louis, 2000) à partir de ces modèles et des cas de SHU observés lors de l'épidémie dans chacune des 2 classes d'âge a été réalisée en fixant les nombres de consommations comme calculés précédemment à 159 dans la classe [0-5 ans[et à 195 dans la classe [5-10 ans[. Le logiciel BRugs (Thomas *et al.*, 2006) a été utilisé. Pour chaque modèle et chaque classe d'âge, dix chaînes de Markov ont été simulées en parallèle, avec une phase d'adaptation de 1000 itérations suivie de 1000 autres itérations. La convergence a été étudiée en visualisant les chaînes graphiquement ainsi qu'à partir du graphe de Brooks, Gelman et Rubin (Brooks et Gelman, 1998).

3.2. Résultats de l'inférence bayésienne

En ce qui concerne la convergence des chaînes de Markov, celle-ci est très vite obtenue pour chacune des chaînes avec le modèle exponentiel et les chaînes se superposent. En ce qui concerne le modèle exponentielle-Poisson, la convergence globale est assez vite obtenue même si une autocorrélation importante est observée sur chacune des chaînes. Par contre en ce qui concerne le modèle bêta-Poisson, même lorsque les itérations sont poursuivies les chaînes ne se superposent pas et restent très dépendantes des conditions initiales. D'autre part une corrélation importante entre les 2 paramètres u et v apparaît ainsi qu'une autocorrélation importante sur chacune des chaînes. Il paraît donc difficile d'obtenir une estimation de ces deux paramètres avec si peu de données observées, ce qui n'est pas très surprenant.

Le tableau suivant donne les estimations obtenues pour les modèles exponentiel et exponentielle-Poisson pour chacune des classes d'âge. Pour chaque paramètre est donnée comme estimation la médiane des chaînes de Markov suivie de l'intervalle de crédibilité à 95% (quantiles à 2,5 et 97,5 % des chaînes de Markov).

Tableau 20 : Estimations des paramètres des modèles dose-réponse pour chaque classe d'âge, accompagnées de l'intervalle de crédibilité à 95%

Modèle dose-réponse	Classe d'âge	
	[0-5 ans[[5-10 ans[
exponentiel	$r : 1,2 \cdot 10^{-3}$ [$5,2 \cdot 10^{-4}$; $2,3 \cdot 10^{-3}$]	$r : 2,5 \cdot 10^{-4}$ [$1,1 \cdot 10^{-4}$; $5,3 \cdot 10^{-4}$]
exponentielle-Poisson	$r_{moy} : 1,5 \cdot 10^{-3}$ [$6,9 \cdot 10^{-4}$; $3,2 \cdot 10^{-3}$]	$r_{moy} : 2,6 \cdot 10^{-4}$ [$1,1 \cdot 10^{-4}$; $6,7 \cdot 10^{-4}$]

En terme de déviance (caractéristique définie par $-2 \ln(\text{vraisemblance})$ et dont la valeur est d'autant plus élevée que le modèle s'écarte des données), le modèle exponentiel donne des déviances de 97 et 64 respectivement pour les classes d'âge [0-5 ans[et [5-10 ans[et le modèle exponentiel-Poisson des déviances de 69 et 58.

Par ailleurs, étant donné que certaines bornes des intervalles de crédibilité sont proches des bornes définies pour la loi *a priori* sur les paramètres r et r_{moy} , les estimations bayésiennes ont été réalisées à nouveau avec la même méthodologie en élargissant juste cette loi *a priori* et en fixant pour le logarithme décimal de ces paramètres une loi uniforme entre -5 et -1, plutôt qu'entre -4 et -2. Ce changement n'a pas d'impact sur les estimations ponctuelles des paramètres des modèles exponentiel et exponentielle-Poisson, et très peu sur les intervalles de crédibilité.

3.3. Quelques éléments de résumé et de discussion

Nous avons choisi ci-dessus de modéliser directement le risque de SHU en fonction de la dose ingérée et proposé deux modèles de forme différentes (exponentiel et exponentielle-Poisson) dont nous avons pu estimé les paramètres pour les classes d'âge [0-5 ans[et [5-10 ans[à partir des données de l'épidémie française de 2005. Nous aurions pu définir un modèle dose-réponse donnant le risque d'infection assorti d'une valeur du risque de SHU en cas d'infection, probabilité qui aurait pu être différente dans les 2 classes d'âge. Néanmoins cette dernière probabilité est mal connue. Il existe quelques informations dans la littérature sur le risque de SHU en cas de maladie et sur le risque de maladie en cas d'infection, mais les valeurs rapportées sont très variables d'une publication à l'autre (cf. partie « loi dose-réponse ») et il

paraît difficile de fixer une valeur par classe d'âge à partir de ces données. Il aurait donc été nécessaire d'estimer ce risque de SHU en cas d'infection à partir de nos données ce qui aurait posé un autre problème de sur-paramétrage du modèle du fait que nous ne disposons pas pour l'épidémie du nombre de malades, mais seulement du nombre de SHU. Enfin cette approche qui est assez souvent utilisée fait implicitement l'hypothèse que le risque de SHU en cas d'infection est indépendant de la dose, ce que nous mettons en doute (*cf.* partie « loi dose-réponse » et Teunis *et al.*, 1999).

L'Institut de veille sanitaire a recueilli après l'épidémie des informations sur les modes de cuisson, les portions ingérées et le statut des convives auprès des familles des malades recensés. Ces données ne permettent pas de connaître le nombre exhaustif de malades car de nombreux malades n'ont sans doute pas été répertoriés, mais une analyse complète de ces données par inférence bayésienne en prenant en compte les données manquantes permettra peut-être au cours de travaux ultérieurs d'affiner les résultats obtenus ici.

4- Etape 3 : simulation de divers scénarios à partir des modèles dose-réponse retenus pour chaque classe d'âge

4.1. Modèles retenus

4.1.1. Appréciation de l'exposition

En ce qui concerne l'appréciation de l'exposition, le modèle décrit à l'étape 1 a été utilisé tel quel.

4.1.2. Appréciation des effets

Nous avons choisi de conserver les deux modèles ajustés sur les classes d'âge [0-5 ans[et [5-10 ans[: modèles exponentiel, exponentielle-Poisson. En ce qui concerne la classe d'âge [10-16 ans[, nous avons conservé les trois modèles de la littérature retenus précédemment : modèles de Teunis, Crockett et Strachan. Pour l'utilisation du modèle de Teunis, le risque de maladie en cas d'infection a été fixé comme précédemment à 0,55. Par ailleurs pour les trois modèles, le risque de SHU en cas de maladie a été fixé à 0,02 d'après les données de la littérature (*cf.* module 6 « loi dose-réponse »). Sur la figure suivante (n°17) ont été représentées les lois de distribution du risque de SHU par ingestion d'une bactérie pour les modèles utilisés dans les trois classes d'âge. Cette figure rend donc compte de la variabilité de la valeur de r associée à l'ingestion d'une seule bactérie, pour chacun des modèles retenus. Pour le modèle exponentiel, aucune variabilité n'est modélisée, d'où la valeur unique de r représentée.

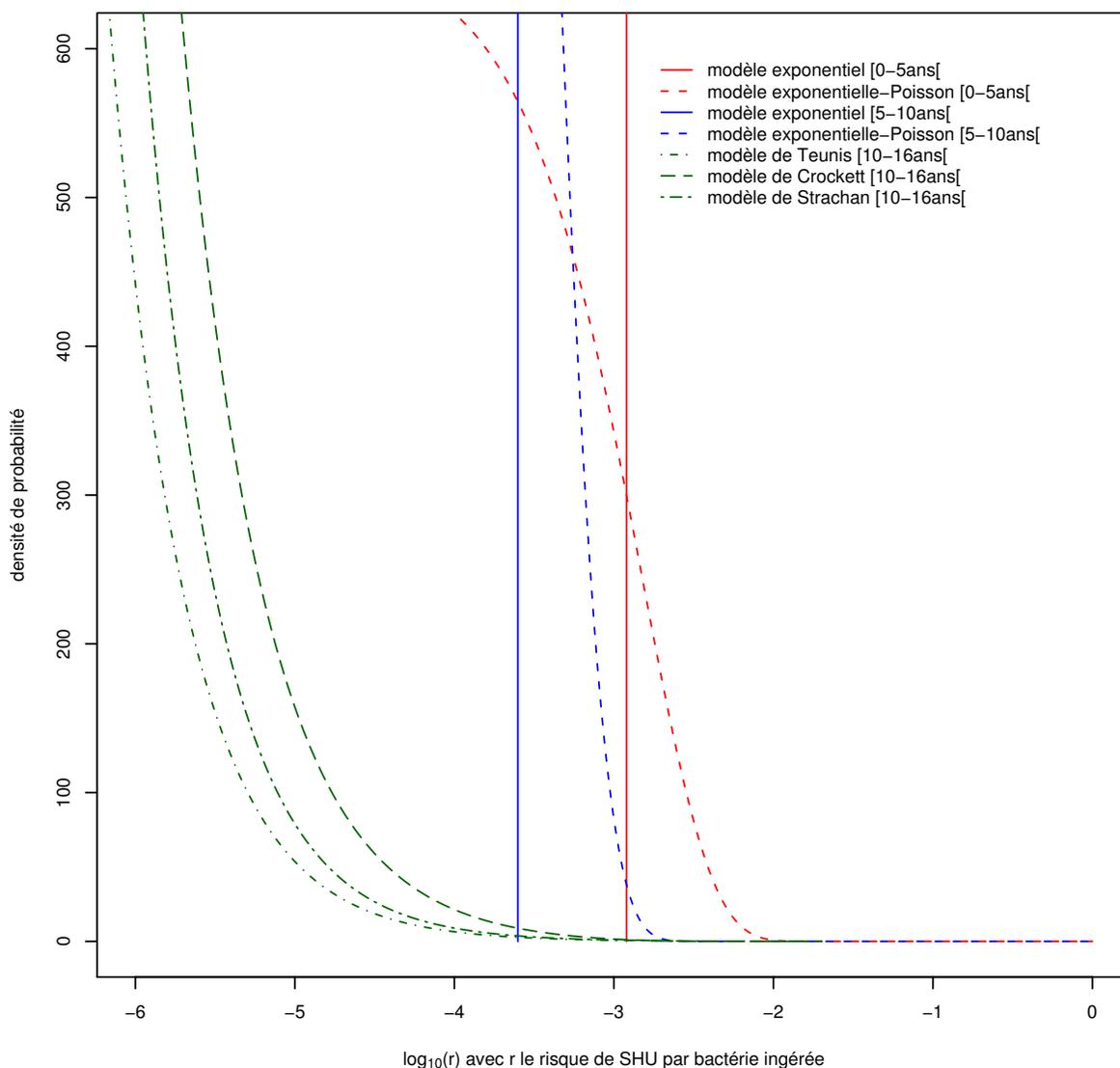


Figure 17 : Distribution du risque de SHU (en logarithme décimal) associé à l’ingestion d’une bactérie pour chacun des modèles dose-réponse retenus sur les trois classes d’âge (les deux traits verticaux correspondent aux valeurs constantes de r dans le modèle exponentiel)

4.1.3. Estimation des risques

L’estimation des risques a été réalisée telle que décrite dans l’étape 1.

4.2. Méthode de simulation

Comme dans l’étape 1, des simulations de type Monte Carlo à une seule dimension ont été réalisées en grand nombre afin d’obtenir des estimations du nombre de SHU lors de l’épidémie de 2005. L’estimation d’un risque individuel moyen pour chaque classe d’âge, chaque modèle dose-réponse et chaque scénario envisagé a ensuite été réalisée toujours à partir de simulations de Monte Carlo à une seule dimension. Chaque valeur du risque individuel moyen a été estimée à partir d’un nombre de simulations adapté au scénario afin d’assurer la convergence du résultat vers une valeur suffisamment précise. En effet plus le niveau de contamination moyen supposé de la viande hachée est faible, plus les doses simulées sont faibles voire majoritairement nulles. Ainsi pour un niveau moyen de contamination supposé très faible, la plupart des simulations donnent un risque individuel nul et il est

donc nécessaire de simuler un nombre beaucoup plus grand de prises alimentaires pour obtenir une estimation précise du risque individuel moyen.

La totalité des simulations ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 2.3.1) (Ihaka et Gentleman, 1996). Une partie des simulations (les simulations de l'épidémie de 2005) ont aussi été réalisées par un second membre du groupe à l'aide du logiciel @Risk en vue de valider les procédures de calcul et les résultats numériques obtenus.

4.2.1. Simulation du nombre de SHU lors de l'épidémie de 2005

Les tableaux suivants donnent les résultats observés pour chaque classe d'âge pour 10 000 simulations de l'épidémie française de 2005, avec les modèles dose-réponse retenus, en terme de nombres de SHU simulés (valeur médiane et quantiles à 2,5 et 97,5%) pour chaque classe d'âge. Rappelons que comme précédemment ces quantiles sont ici les quantiles de la distribution du nombre de SHU liée à toutes les sources de variabilité prises en compte dans le modèle, et au fait que le nombre estimé de consommations chez les enfants de moins de 16 ans n'est pas très élevé (588).

Tableau 21 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de SHU dans la classe d'âge [0 – 5 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 159 prises alimentaires dans cette classe d'âge

Modèle	Médiane du nombre de SHU	Quantile à 2,5% du nombre de SHU	Quantile à 97,5% du nombre de SHU
Exponentiel	7	3	13
Exponentielle-Poisson	8	3	14

Tableau 22 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de SHU dans la classe d'âge [5 – 10 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 195 prises alimentaires dans cette classe d'âge

Modèle	Médiane du nombre de SHU	Quantile à 2,5% du nombre de SHU	Quantile à 97,5% du nombre de SHU
Exponentiel	5	1	10
Exponentielle-Poisson	5	1	10

Tableau 23 : Quantiles à 2,5%, 50% et 97,5% des valeurs simulées du nombre de SHU dans la classe d'âge [10 – 16 ans[avec les 3 modèles dose-réponse sur un total de 196 prises alimentaires dans cette classe d'âge

Modèle	Médiane du nombre de SHU	Quantile à 2,5% du nombre de SHU	Quantile à 97,5% du nombre de SHU
Crockett	1	0	2
Strachan	1	0	1
Teunis	1	0	1

Ces résultats permettent juste de vérifier que notre modèle intégrant les modèles dose-réponse retenus sur les trois classes donne des estimations des nombres de SHU cohérentes avec les nombres observés lors de l'épidémie de 2005. Rappelons qu'il y avait eu 10 cas dans la classe [0-5 ans[, 6 dans la classe [5-10 ans[et 0 dans la classe [10-16 ans[.

4.2.2. Simulation du risque individuel de SHU en fonction de la concentration en pathogène dans la viande avant cuisson

A partir de ce modèle, nous avons fait varier la concentration du pathogène dans la viande hachée sans modifier les autres paramètres du modèle. Pour chaque valeur de cette concentration nous avons estimé pour chaque classe d'âge un risque individuel moyen qui correspond au risque de déclarer un SHU après une prise alimentaire, toujours en prenant en compte le modèle de cuisson de la viande intégrant les données correspondant à la restauration familiale. La figure suivante représente les courbes de risque individuel moyen simulé à l'aide des modèles retenus et pour les trois classes d'âge, en fonction de la concentration en pathogène dans la viande hachée avant cuisson. La plus petite valeur de concentration en abscisse ($C_{mêlée} = 5.10^{-5}$ ufc.g⁻¹) correspond à l'estimation retenue de la concentration moyenne en *Escherichia coli* O157:H7 dans les mêlées françaises à partir des données de Vernozy-Rozand *et al.* (2002) en supposant que toutes les mêlées sont très faiblement contaminées (cf. module 2 « prévalence et niveau de contamination »). La plus grande valeur de la concentration en abscisse ($C_{mêlée} = 5,9$ ufc.g⁻¹) correspond au niveau estimé de la contamination de la mêlée incriminée lors de l'épidémie de 2005.

Pour une forte concentration les valeurs simulées de la dose ingérée sont majoritairement non nulles, par contre quand la concentration passe en dessous de 1.10^{-3} ufc.g⁻¹ plus de 99% des doses ingérées simulées sont nulles pour la classe d'âge [0-5 ans[, plus de 98% pour la classe [5-10 ans[et plus de 97% pour la classe [10-16 ans[. A cette concentration les rares doses simulées non nulles sont par ailleurs majoritairement d'une seule cellule par portion. On ne peut donc plus vraiment raisonner en terme de « dose ingérée » pour ces très faibles concentrations, mais en terme de probabilité de présence résiduelle du pathogène après cuisson.

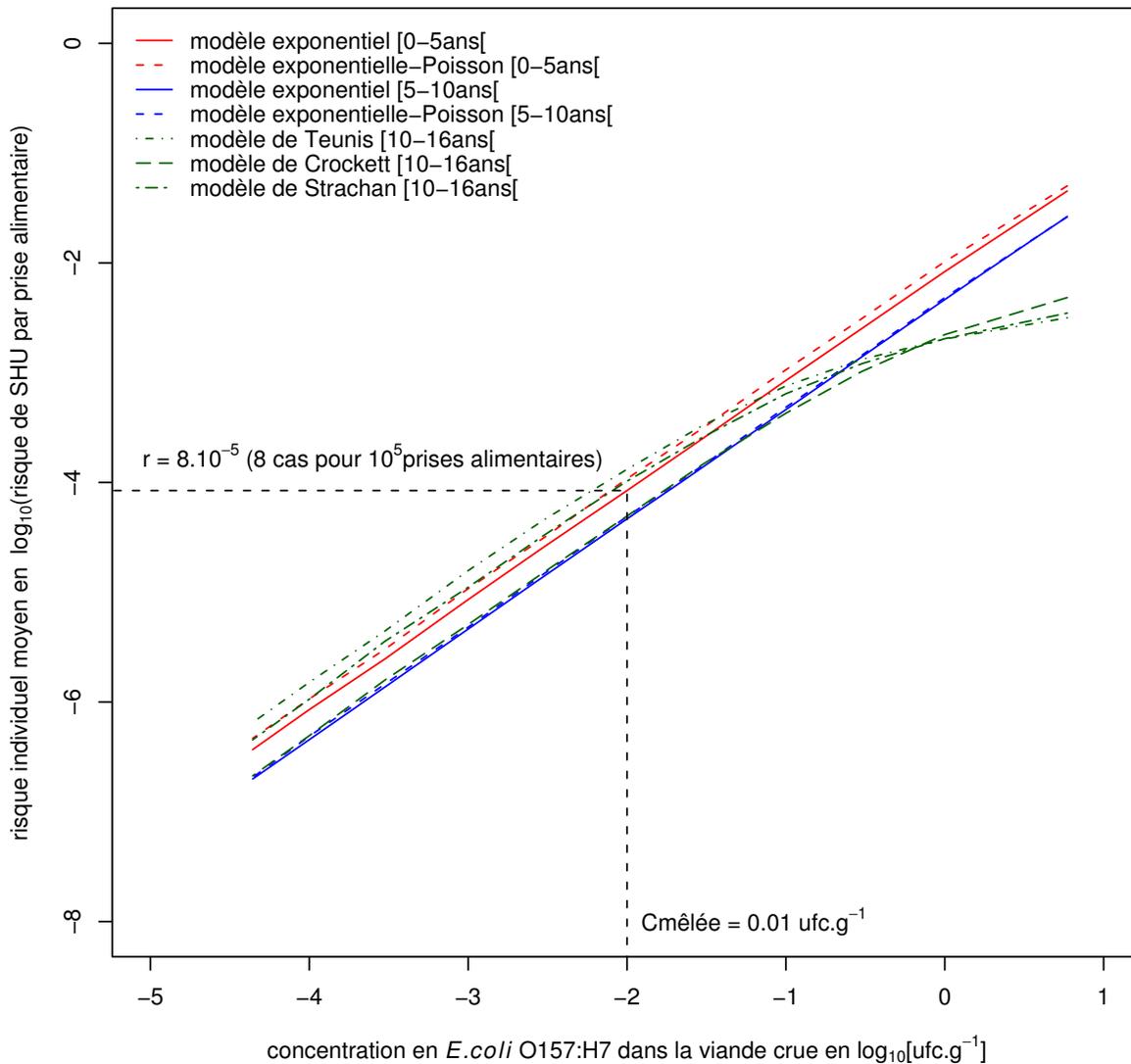


Figure 18 : Risque individuel moyen de SHU lié à une prise alimentaire de steak haché surgelé cuit selon les modalités observées en restauration familiale, en fonction de la concentration en pathogène dans la viande hachée crue, pour les trois classes d'âge et les divers modèles dose-réponse retenus. Une clef de lecture est ajoutée à la figure sous forme d'un exemple de lecture : pour une concentration donnée dans la mêlée de viande crue lue en abscisse (sur l'exemple $C_{mêlée} = 0,01 \text{ ufc.g}^{-1} = -2\log_{10}[\text{ufc.g}^{-1}]$) on peut lire en ordonnée pour un modèle et une classe d'âge donné (sur l'exemple avec le modèle exponentiel sur la classe [0-5 ans[) le risque individuel moyen de SHU (sur l'exemple $\log_{10}(r) = -4,1$ d'où $r = 8.10^{-5}$) qui peut être exprimé en nombre de cas de SHU estimé pour un nombre donné de prises alimentaires (sur l'exemple 8 cas pour 10^5 prises alimentaires).

Rappelons que l'utilisation pour des concentrations très faibles de modèles dose-réponse ajustés à partir de données d'épidémie donc avec des concentrations élevées doit rester très prudente. En théorie, il faudrait pouvoir valider ces modèles à des concentrations faibles mais cela paraît bien difficile.

Les différents modèles donnent une estimation du risque individuel d'un peu moins d'un cas pour un million de prises alimentaires quelle que soit la classe d'âge (entre 0,2 et 0,7 cas) pour la concentration la plus faible envisagée ($5 \cdot 10^{-5}$ ufc.g⁻¹) (cf. tableaux ci-dessous).

Pour chaque modèle, chaque classe d'âge et chaque valeur de concentration moyenne dans la viande crue, la figure 18 donne une estimation du risque individuel moyen, tenant compte de toutes les sources de variabilité décrites dans notre modèle d'AQR (sur la portion ingérée, le mode de cuisson...). Cette figure pourrait laisser croire à tort que ce risque individuel moyen est précisément connu. Il est bien évident qu'il est entaché d'incertitude, mais celle-ci reste difficile à évaluer du fait que nous nous sommes basés sur des simulations de Monte Carlo ne prenant en compte que les sources de variabilité. Une des sources d'incertitude réside dans l'estimation du (ou des) paramètre(s) du modèle dose-réponse. Pour les quatre modèles construits à partir des données de l'épidémie (cf. paragraphe 3), une façon simple de prendre en compte l'incertitude liée à l'estimation du paramètre du modèle dose-réponse (r pour le modèle exponentiel ou r_{moy} pour le modèle exponentielle-Poisson), est de tracer à nouveau la courbe donnant le risque individuel moyen en prenant comme valeurs de ce paramètre successivement les deux bornes de son intervalle de crédibilité à 95% (donné dans le paragraphe 3.2). Les courbes ainsi obtenues ont été tracées sur la figure 19, pour les classes d'âge [0 – 5 ans[et [5 – 10 ans[et les modèles exponentiel et exponentielle-Poisson. Ainsi la valeur de 8 cas pour 10^5 prises alimentaires lue dans la figure 18 pour une concentration de $0,01$ ufc.g⁻¹ (modèle exponentiel, classe d'âge [0 – 5 ans[) est associée à un intervalle d'incertitude de 4 à 16 cas pour 10^5 prises alimentaires. Notons que cet intervalle d'incertitude ne rend compte que d'une partie de l'incertitude et sous-estime donc celle-ci. Une prise en compte de toutes les sources d'incertitude tout au long de l'étude serait nécessaire pour affiner cette estimation.

On peut voir sur la figure 18 et 19 que les modèles exponentiel et exponentielle-Poisson donnent des estimations du risque individuel assez proches, avec une marge d'incertitude un petit peu plus grande avec le modèle exponentielle-Poisson. On peut aussi observer sur ces deux figures que les deux modèles estiment un risque individuel moyen lors d'une prise alimentaire à peu près deux fois plus grand dans la classe d'âge [0 – 5 ans[par rapport à la classe d'âge [5 – 10 ans[. La plus forte cuisson des steaks servis aux très jeunes enfants et la plus petite taille des portions tend donc à atténuer l'impact de leur plus grande sensibilité au pathogène. Rappelons que les estimations des paramètres des lois dose-réponse obtenues au paragraphe 3.2 décrivaient une sensibilité au pathogène des enfants de moins de 5 ans environ 5 fois plus élevée que celle des [5 – 10 ans[.

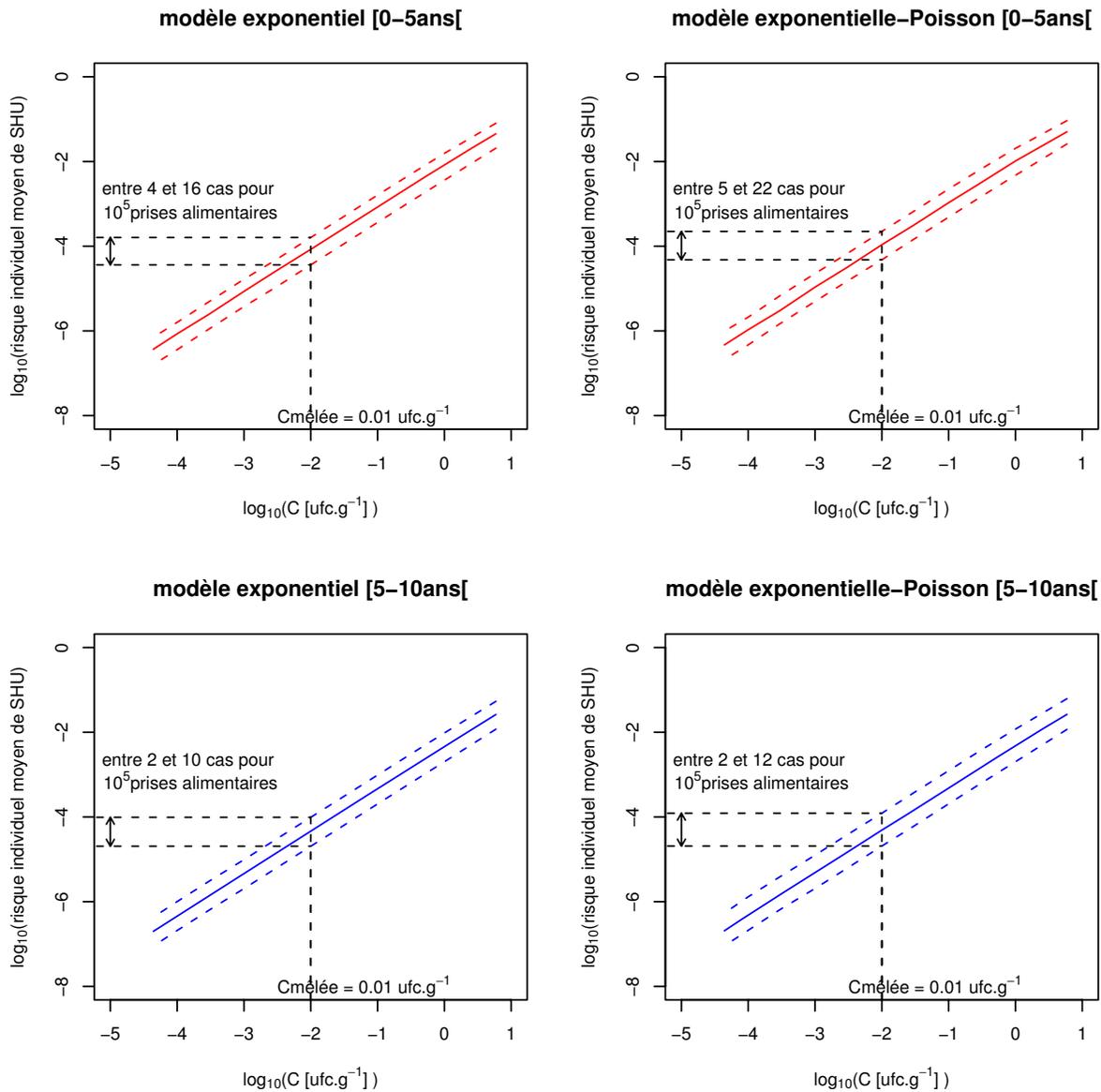


Figure 19 : Courbes de risque individuel moyen de SHU intégrant une partie de l'incertitude : risque individuel moyen de SHU lié à une prise alimentaire de steak haché surgelé cuit selon les modalités observées en restauration familiale en fonction de la concentration en pathogène dans la viande crue, pour les classes d'âge [0 – 5 ans[et [5 – 10 ans[et les modèles dose-réponse retenus. Pour chaque modèle dose-réponse, les lignes pleines ont été obtenues à partir de l'estimation ponctuelle du paramètre du modèle (r ou r_{moy} respectivement pour les modèles exponentiel et exponentielle-Poisson) et les lignes pointillées ont été obtenues à partir des bornes de l'intervalle de crédibilité de ce paramètre. Rappelons que cet intervalle d'incertitude ne rend compte que d'une partie de l'incertitude et sous-estime donc celle-ci Une clef de lecture a été ajoutée à chaque figure : sur la première on peut lire par exemple que pour une concentration dans la viande crue de $0,01 \text{ ufc.g}^{-1}$ ($C_{\text{mélée}} = -2\log_{10}[\text{ufc.g}^{-1}]$) le risque individuel moyen de SHU est estimé entre 4 et 16 cas pour 10^5 prises alimentaires ($\log_{10}(\text{risque})$ entre -4,4 et -3,8)

La consommation annuelle de steaks hachés surgelés en foyer par les moins de 16 ans a été estimée à 47,8 millions de consommations chez les [0-5 ans[, 58,5 millions chez les [5-10 ans[et 58,6 millions chez les [10-16 ans[, en tenant compte du fait que seulement 42% des steaks

hachés consommés en foyer sont des produits surgelés. Si l'on considère que la concentration de 5.10^{-5} ufc.g⁻¹ est représentative de la concentration moyenne dans l'ensemble des mêlées françaises (cf. module 2 « prévalence et niveau de contamination »), la deuxième colonne des tableaux ci-dessous donne des estimations de nombres de cas sporadiques de SHU liés à la consommation en restauration familiale de steaks surgelés. Les études épidémiologiques indiquent sur les dix dernières années des moyennes respectives de 64, 13 et 5 cas sporadiques de SHU par an chez les enfants des classes d'âge respectives [0-5 ans[, [5-10 ans[et [10-16 ans[(Espié *et al.*, 2006). Par ailleurs parmi ces cas, 60% seulement indiquent la consommation de steak haché sans indication ni du mode de conditionnement ni du lieu de consommation. La part du nombre de cas sporadiques de SHU liée à la consommation en restauration familiale de steak surgelé est donc sans doute inférieure à la moitié des chiffres totaux rapportés. Dans la classe d'âge [0 – 5 ans[, les modèles dose-réponse exponentiel et exponentielle-Poisson semblent donner des estimations cohérentes avec les données épidémiologiques. Dans la classe d'âge [5 – 10 ans[le modèle exponentiel et le modèle exponentielle-Poisson donnent des estimations un peu élevées par rapport à ces données. Enfin dans la classe d'âge [10 – 16 ans[tous les modèles semblent surestimer le nombre de cas sporadiques même si le modèle de Crockett donne l'estimation la plus cohérente avec les données épidémiologiques.

Tableau 24 : Estimations du risque individuel moyen de SHU et du nombre de cas sporadiques de SHU dans la classe d'âge [0 – 5 ans[avec les 2 modèles dose-réponse pour une concentration en *Escherichia coli* O157:H7 dans la viande hachée de 5.10^{-5} ufc.g⁻¹

Modèle	Risque individuel moyen estimé en nombre de cas pour 10 ⁶ prises alimentaires	Nombre de cas sporadiques par an (estimé pour une consommation annuelle de 48.10 ⁶ prises alimentaires)
Exponentiel	0,37	18
Exponentielle-Poisson	0,47	22

Tableau 25 : Estimations du risque individuel moyen de SHU et du nombre de cas sporadiques de SHU dans la classe d'âge [5 – 10 ans[avec les 2 modèles dose-réponse pour une concentration en *Escherichia coli* O157:H7 dans la viande hachée de 5.10^{-5} ufc.g⁻¹

Modèle	Risque individuel moyen estimé en nombre de cas pour 10 ⁶ prises alimentaires	Nombre de cas sporadiques par an (estimé pour une consommation annuelle de 58.10 ⁶ prises alimentaires)
Exponentiel	0,20	12
Exponentielle-Poisson	0,21	12

Tableau 26 : Estimations du risque individuel moyen de SHU et du nombre de cas sporadiques de SHU dans la classe d'âge [10 – 16 ans[avec les 2 modèles dose-réponse pour une concentration en *Escherichia coli* O157:H7 dans la viande hachée de 5.10^{-5} ufc.g⁻¹

Modèle	Risque individuel moyen estimé en nombre de cas pour 10 ⁶ prises alimentaires	Nombre de cas sporadiques par an (estimé pour une consommation annuelle de 59.10 ⁶ prises alimentaires)
Crockett	0,21	12
Strachan	0,45	26
Teunis	0,65	38

4.2.3. Simulation du risque individuel de SHU pour divers scénarios de cuisson

Afin de bien visualiser l'impact du mode de cuisson sur le risque individuel moyen de SHU lors d'une consommation, nous avons simulé d'autres scénarios de cuisson par tous les consommateurs suivant un seul même mode de cuisson. La figure suivante représente par exemple les résultats obtenus pour la classe d'âge [0 - 5 ans[avec le modèle dose-réponse exponentiel et pour les trois modes de cuisson. Cette figure se lit de la même façon que la figure précédente. Pour une concentration en pathogène dans la mèche au niveau estimé lors de l'épidémie de 2005 ($C_{mèche} = 5,9 \text{ ufc.g}^{-1}$), le risque de SHU par prise alimentaire prend les valeurs 0,283 (283 cas pour 1000 prises alimentaires), 0,133 (129 cas pour 1000 prises alimentaires), 0,072 (72 cas pour 1000 prises alimentaires) et 0,006 (6 cas pour 1000 prises alimentaires) respectivement pour les modes de consommation « cru », « saignant », « rosé » et « bien cuit ». Le passage du mode « rosé » au mode « bien cuit » permet donc de réduire d'un facteur supérieur à 10 le risque de développer un SHU, alors que le passage du mode « cru » à « saignant » ne réduit le risque que d'un facteur 2. Des résultats similaires pourraient être montrés avec les autres concentrations (les courbes de la figure 18 étant presque parallèles) mais aussi avec les autres classes d'âge et les autres modèles, les risques relatifs d'un mode de cuisson à l'autre ne dépendant pas fortement ni du modèle dose-réponse ni de la classe d'âge.

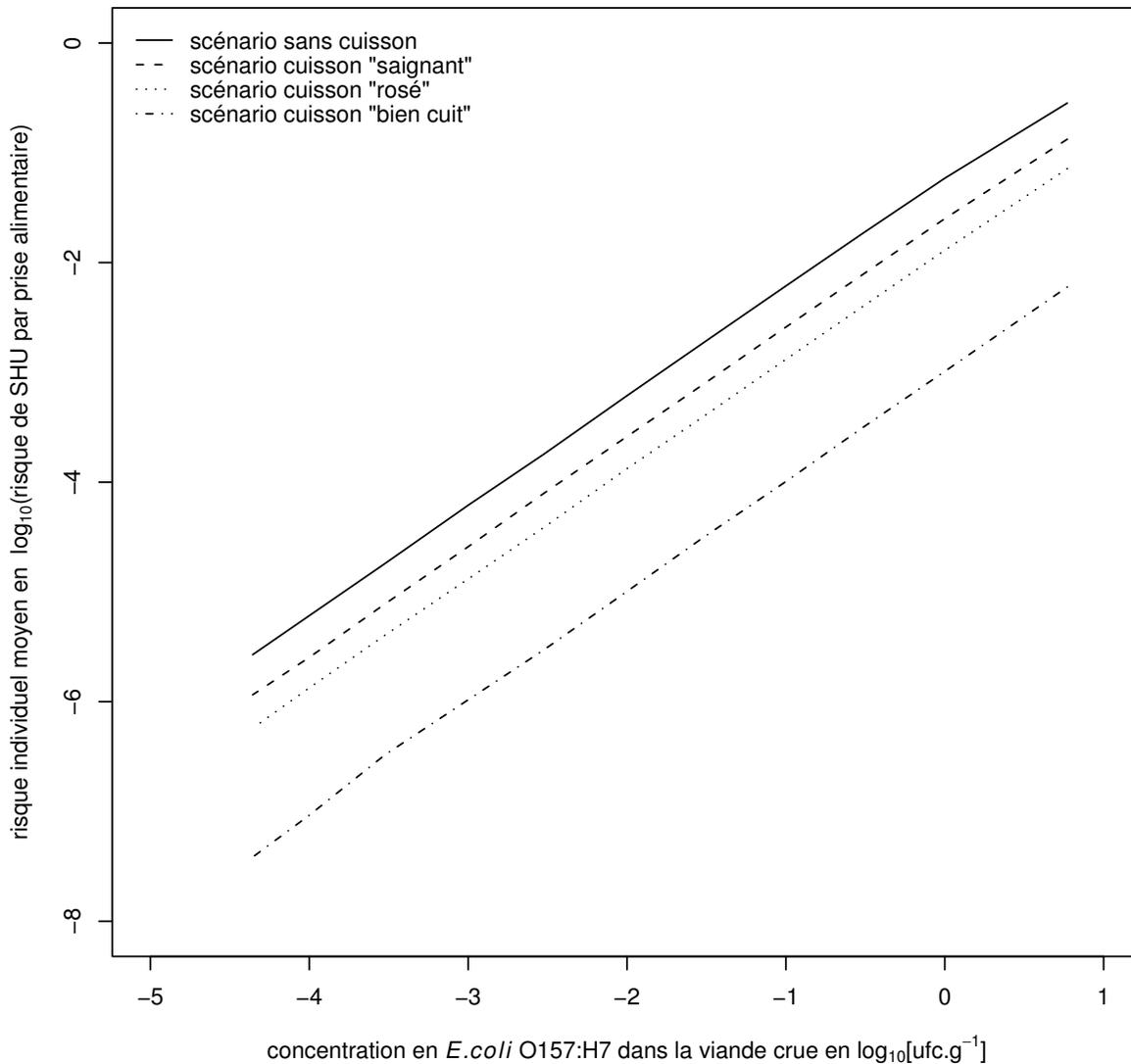


Figure 20 : Risque individuel moyen de SHU lié à une prise alimentaire de steak haché surgelé en fonction de la concentration en pathogène dans la viande hachée crue, pour les moins de 5 ans et le modèle dose-réponse exponentiel, en fonction du mode de cuisson

5- Conclusions et discussion

Ce travail a mis en évidence l'inadéquation des modèles dose-réponse de la littérature pour décrire la plus grande sensibilité des très jeunes enfants au pathogène *Escherichia coli* O157:H7. A partir des données épidémiologiques relatives à l'épidémie française de 2005 et grâce à une approche originale, nous avons pu proposer deux autres modèles dose-réponse pour les enfants des classes d'âge [0 – 5 ans[et [5 – 10 ans[. Cette approche a par ailleurs montré que les enfants de la classe [0 – 5 ans[étaient plus sensibles au pathogène que les enfants de la classe [5 – 10 ans[avec des estimations des paramètres des lois dose-réponse clairement différentes pour ces deux classes d'âge. Ces nouvelles lois dose-réponse ont été intégrées au modèle global d'AQR et utilisées pour simuler le risque individuel moyen de SHU en fonction de la concentration du pathogène dans la viande crue. Les résultats obtenus ont été confrontés

aux données épidémiologiques relatives aux cas sporadiques de SHU en France. Cette confrontation montre que le modèle dose-réponse exponentiel et le modèle exponentielle-Poisson estimés sur les classes d'âge [0 – 5 ans[et [5 – 10 ans[ont donné des valeurs proches et assez cohérentes avec les données épidémiologiques. Enfin le modèle d' AQR avec le modèle dose-réponse exponentiel a été utilisé sur la classe d'âge [0 – 5 ans[pour simuler 4 scénarios de cuisson afin de quantifier l'impact du mode de cuisson sur le risque de SHU. Il est apparu qu'une cuisson « rosé » ne permettait pas de réduire considérablement le risque et qu'une cuisson « bien cuit » était préférable même si ce dernier mode de cuisson ne permettait pas encore d'assurer un risque nul.

Comme dans toute approche de modélisation un certain nombre d'hypothèses simplificatrices ont été faites dans ce travail qui méritent d'être discutées. Comme indiqué dès le début de cette partie nous avons choisi de réaliser des simulations de Monte Carlo à une dimension sans prendre en compte la dimension d'incertitude. Une étude plus poussée pourrait être menée afin d'ajouter cette dimension à notre modèle d'AQR. Néanmoins les résultats principaux n'en seraient sans doute pas notablement modifiés du fait que la plupart des incertitudes non prises en compte sont relativement faibles. En effet la variabilité sur les modes de cuisson, la masse des portions consommées, la distribution du nombre de prises alimentaires dans les classes d'âge ont été obtenues à partir d'enquêtes de consommation réalisées sur des effectifs assez élevés (cf. module 3 « consommation »). La concentration en pathogène dans la mèche incriminée lors de l'épidémie de 2005 est aussi connue de façon assez précise (intervalle de crédibilité entre 3 et 9 ufc.g⁻¹, cf. module 2 « prévalence et niveau de contamination »). La plus forte incertitude non prise en compte est vraisemblablement celle sur le nombre réel de prises alimentaires lors de l'épidémie de 2005, étant donné que nous avons considéré que tous les produits non retirés et non rapportés avaient été consommés ce qui conduit vraisemblablement à une surestimation du nombre de prises alimentaires.

Par ailleurs nous n'avons considéré qu'un seul mode de cuisson des steaks, la cuisson à la poêle avec un seul retournement à mi-cuisson, mode de cuisson majoritairement utilisé par les consommateurs français. La prise en compte d'autres modes de cuisson nécessiterait la réalisation d'expérimentations complémentaires. Nous avons aussi considéré que les consommateurs ne décongelaient pas le produit avant cuisson (pratique majoritaire) et la prise en compte d'autres modes de préparation nécessiterait là encore la réalisation d'autres études expérimentales ainsi que d'autres enquêtes de consommation.

Synthèse

L'Afssa a publié en 2003 un « Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC¹⁰) », une famille de bactéries responsables de diarrhées bénignes mais aussi de diarrhées sanglantes, et du syndrome hémolytique urémique (SHU) avec des possibilités de séquelles rénales graves, voir de mortalité. Les personnes âgées peuvent présenter des purpuras thrombotiques thrombocytopéniques. Elles représentent, avec les enfants, les 2 populations à risque ; chez ces derniers, le risque est maximum entre 1 et 2 ans puis diminue jusqu'à 15 ans. La morbidité causée par les STEC est stable dans la plupart des pays industriels (incidence annuelle de 1,5 à 20 cas par million d'habitants selon le pays), et la létalité est limitée. On observe régulièrement des épidémies aux États-Unis et au Canada, et quelques épidémies ont été observées en Europe et au Japon.

Des études épidémiologiques conduites en France ont montré que la consommation de steaks hachés de bœuf est le premier facteur de risque de SHU. Aussi, pour compléter le bilan de 2003, le groupe de travail a conduit une appréciation quantitative des risques (AQR) de maladie provoquée par l'ingestion de steaks hachés de bœuf contenant des STEC.

Il a d'abord recensé les données de la littérature scientifique internationale et de la littérature grise (rapports, comptes-rendus etc.) utilisables pour décrire la situation en France, et déterminer, parmi les données manquantes, celles qu'il était possible d'acquérir dans le temps compatible avec la réflexion du groupe de travail et en respectant les moyens alloués. Cette réflexion a conduit à **limiter le champ de l'étude aux maillons de la chaîne alimentaire allant du steak haché surgelé jusqu'aux symptômes chez le consommateur.**

En parallèle, le groupe a analysé les publications (Canada, 1998 ; Pays-Bas et États-Unis, 2001) concernant les appréciations quantitatives du risque de maladies provoquées par les *E. coli* O157:H7. Les conditions d'élevage, d'abattage, de transformation et de consommation dans les trois pays étaient trop différentes de celles prévalant en France pour permettre une exploitation des résultats. Toutefois, chaque étude proposait des méthodologies différentes qui ont inspiré les travaux du groupe.

Des lors, le groupe a adopté une méthode de travail suivant la démarche recommandée par le Codex alimentarius pour faire une appréciation quantitative du risque en France comportant les étapes suivantes :

- (1) **identification du danger** : rapport de 2003 ;
- (2) **appréciation quantitative de l'exposition** : contamination des steaks hachés au moment de leur consommation, ou quantité de STEC à laquelle le consommateur est exposé ;
- (3) **appréciation quantitative des effets**, et de la **relation dose-réponse** : probabilité d'un effet morbide chez le consommateur en fonction de la dose (quantité de STEC dans une portion consommée). Au début du travail, il existait peu de données disponibles. L'épidémie de STEC dans des steaks surgelés (sud-ouest de la France, automne 2005) a permis de collecter les données épidémiologiques sur les malades (InVS) et les données microbiologiques sur les produits (laboratoire de microbiologie alimentaire et prévisionnelle). Ces données ont permis de compléter celles de la littérature et de proposer

¹⁰ Prononcer « essetek »

des relations dose-réponse pour le SHU chez les enfants de moins de cinq ans et ceux ayant de cinq à neuf ans.

(4) **l'estimation du risque** : l'estimation du nombre de cas d'effets morbides dans la population étudiée.

1- Appréciation de l'exposition :

1.1. Consommation de steak haché

A partir de quatre enquêtes, notamment de l'enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires réalisée en 2006 (INCA2) et celle de la société Secodip sur les achats des ménages en 2004, ont été obtenus la distribution de la taille des portions et le nombre des portions de steaks consommées pour les trois classes d'âge étudiées : de la naissance à l'anniversaire des cinq ans, notée [0-5[dans le rapport ; de l'anniversaire des cinq ans à celui des 10 ans, notée [5-10[; de l'anniversaire des 10 ans à celui des 16 ans, notée [10-16[;

Les effectifs de ces classes d'âge ont été estimés pour la population générale française à partir des données de l'INSEE.

1.2. Contamination des steaks hachés industriels par des STEC

A partir des données disponibles pour la France, les estimations sont les suivantes :

- en situation habituelle, la concentration moyenne de STEC dans les steaks hachés de bœuf est estimée à 5.10^{-5} ufc/g (intervalle de crédibilité¹¹ à 95% : $1,5.10^{-5}$ à $1,0.10^{-4}$) ;
- lors de l'épidémie de 2005, la concentration des cellules de STEC dans les steaks hachés incriminés était en moyenne 5,9 ufc/g (intervalle de crédibilité à 95% : 3 à 9), avec une distribution obéissant à la loi de Poisson.

Le niveau de contamination des steaks hachés en situation épidémique était donc environ 120 000 fois supérieur au niveau estimé en dehors de la situation d'épidémie (situation habituelle).

1.3. Modes de cuisson

Devant l'absence d'information bibliographique disponible sur le degré de cuisson des steaks de bœufs consommés par les enfants des différentes classes d'âge, le groupe de travail a réalisé une enquête avec un questionnaire simple, associé à la photographie d'un steak cru et de steaks présentant trois degrés de cuisson caractéristiques.

Avec 589 questionnaires exploitables, il apparaît que près de 50% des enfants de moins de 5 ans mangent les steaks bien cuits ; le pourcentage dans les deux classes d'âge suivantes est respectivement de 27 et 24%. La consommation de steaks saignants croît avec l'âge des enfants.

1.4. Effet assainissant de la cuisson

Les travaux publiés dans la littérature scientifique internationale fournissent les informations sur la cinétique de destruction des STEC par la chaleur dans la viande hachée de bœuf. Les

¹¹ Il s'agit d'un intervalle de crédibilité et non d'un intervalle de confiance, parce que l'estimation a été faite en suivant une approche bayésienne.

temps de réduction décimale (temps nécessaire pour diviser la population bactérienne par dix-RD) sont donc connus en fonction de la température. Néanmoins, cette information est inutilisable sans une connaissance fine du profil (spatial et temporel) de température dans le steak haché avec les modes de cuisson utilisés en France. Les essais réalisés au laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et procédés agro-alimentaires (Afssa/Lerqap), confirment qu'il existe une hétérogénéité de température dans le steak après cuisson à la poêle avec, pour un même aspect visuel d'un steak cuit, une variabilité notable de la température atteinte à cœur. Pour modéliser l'effet destructeur d'un type de cuisson donné, on ne peut donc pas utiliser une valeur unique. Il a été décidé de représenter les résultats par des distributions uniformes du nombre de réductions décimales obtenus pour les trois degrés de cuisson, comme illustré ci dessous.

Tableau 27 : Efficacité de la cuisson à la poêle avec un seul retournement.

Type de cuisson	Nombre de réductions décimales	Facteur par lequel le nombre de bactéries est divisé	Pourcentage de destruction
Saignant	0 à 0,9	1 à 7,9	0 à 87 %
Rosé	0,2 à 1,4	1,6 à 25	37 à 96 %
Bien cuit	1,2 à 2,8	16 à 630	94 à 99,8 %

Eu égard aux habitudes de consommation prévalant aujourd'hui en France dans les ménages, ces résultats mettent en évidence les limites des effets de la cuisson à la poêle avec un seul retournement sur la destruction des STEC, et donc l'importance que revêt l'hygiène de la production des steaks hachés. Ils confirment en outre l'importance d'assurer une cuisson à cœur des steaks hachés destinés aux jeunes enfants.

2- Appréciation des effets : relation dose-réponse

A partir de relations dose-réponse publiées dans le cadre d'essais récents sur volontaires sains et lors d'épidémies, le groupe a évalué la probabilité d'infection après l'ingestion d'une bactérie : celle-ci est faible, mais la **probabilité de SHU en cas de maladie**, est de :

- 8 à 12% de 0 à 5 ans ;
- 2 à 5% de 6 à 16 ans.

Cependant, il est à noter que les publications concernant les **essais sur volontaires sains** sont critiquables car ceux-ci ne sont pas représentatifs des populations à risques (enfants et personnes âgées), et les souches utilisées ne provoquaient que des troubles bénins.

Les publications concernant les **épidémies** causées par des STEC reposent sur des hypothèses, notamment sur l'exposition, parfois discutables. En effet, toutes les relations dose-réponse publiées reposent sur les hypothèses suivantes :

- (1) chaque cellule bactérienne peut provoquer l'effet étudié avec une probabilité r ,
- (2) chaque cellule agit indépendamment des autres cellules,
- (3) les cellules sont réparties dans l'aliment selon la loi de Poisson,
- (4) la probabilité r n'est pas identique pour toutes les cellules bactériennes mais est distribuée selon une loi bêta.

Les deux premières hypothèses font l'objet de controverses, mais aucune autre proposition n'a été formulée jusqu'ici. Les trois premières hypothèses conduisent à la formulation d'une

relation exponentielle dont r est le seul paramètre. L'ajout de la quatrième hypothèse conduit à une équation dite « bêta-Poisson », à deux paramètres α et β .

Le groupe a retenu trois équations de type « bêta-Poisson », dont une est basée sur des données relatives à *Shigella* (Crockett et coll. 1996), et deux autres sur des données d'épidémies provoquées par des STEC (Teunis *et al.* 2004, Strachan *et al.* 2005). Il est observé qu'avec ces trois équations, la dose provoquant la maladie chez un consommateur sur dix est la même (environ 10 cellules bactériennes) mais la dose provoquant la maladie chez un consommateur sur deux (DM_{50}) diffère considérablement (de 10^3 à 3.10^8 bactéries).

3- Estimation du risque

Les informations collectées au cours des étapes précédentes ont été reprises et combinées pour estimer le nombre de SHU par an et le comparer aux chiffres de l'épidémie française de 2005 dans les trois classes d'âges. Les résultats obtenus sont différents :

- 2 cas de SHU estimés au lieu de 10 cas observés en 2005 chez les enfants de moins de cinq ans,
- 1 ou 2 cas de SHU estimés au lieu de 6 cas observés en 2005 chez les enfants de cinq à 10 ans,
- 0 à 1 de SHU cas estimés au lieu de 0 cas observés chez les enfants de 10 à 16 ans.

Les trois équations de la littérature utilisées par le groupe de travail sous estiment donc le nombre de cas cliniques pour les deux premières classes d'âge. Pour les enfants les plus âgés, l'estimation est satisfaisante.

4- Établissement de nouvelles relations dose réponse

Ainsi, le groupe de travail a décidé d'établir des relations plus réalistes, en suivant une approche bayésienne. Trois modèles différents ont été testés avec un seul paramètre (équations exponentielle et exponentielle-Poisson), ou avec deux paramètres (équation bêta-Poisson). Le dernier de ces modèles est le plus pessimiste, mais le plus sécuritaire. Le modèle le plus simple, qui utilise l'équation exponentielle à un seul paramètre, offre un bon compromis entre la qualité de l'estimation et la convergence des calculs. Ces trois modèles permettent de proposer des relations dose-réponse pour les deux premières classes d'âge.

Ainsi avec une équation exponentielle, la probabilité de développer une maladie avec 1 cellule bactérienne est de :

- première classe d'âge, $r = 1,2.10^{-3}$ (intervalle de crédibilité 95% : $5,2.10^{-4}$ à $2,3.10^{-3}$),
- deuxième classe d'âge, $r = 2,5.10^{-4}$ (intervalle de crédibilité : $1,1.10^{-4}$ à $5,3.10^{-4}$) : les enfants de cette classe seraient 4,8 fois moins sensibles que les plus jeunes.

À titre de comparaison, pour *Listeria monocytogenes* l'ordre de grandeur de r est 10^{-13} à 10^{-14} pour les formes sévères de listériose, en fonction de la susceptibilité des consommateurs. Une concentration de quelques cellules de STEC par gramme dans un lot d'aliment suffit à provoquer une épidémie de diarrhées, diarrhées sanglantes et/ou SHU, tandis qu'une épidémie de listériose sévère se produit seulement quand la concentration de *L. monocytogenes* est extrêmement élevée.

La figure 18 montre la probabilité moyenne de développer un SHU du fait de la consommation en restauration familiale d'une portion de viande hachée de bœuf achetée surgelée, provenant de la filière industrielle française.

Plus simplement, la formule « **Risque = Concentration x 10⁻²** » peut être utilisée pour avoir une estimation du risque individuel moyen de SHU chez l'enfant de moins de 10 ans en fonction de la concentration par gramme dans la mèche crue.

Par exemple, pour une concentration de 5 bactéries par gramme, l'ordre de grandeur du risque est de 5% (c'est à dire 5 SHU pour 100 enfants de moins de 10 ans ayant consommé du steak haché).

Ces graphiques et formules pourraient être utilisés pour aider à la gestion du risque.

5- Limites de l'étude et perspectives

Ce travail d'appréciation quantitative des risques a permis de mettre en évidence le manque d'information sur les STEC en amont de l'étape de surgélation, c'est-à-dire de la production primaire (élevage) à l'abattage, au hachage et au conditionnement ; des travaux importants devraient être entrepris pour évaluer ce maillon de la chaîne alimentaire. D'autres produits offerts au consommateur n'ont pas non plus été étudiés (par exemple les steaks de bœuf vendus réfrigérés sous atmosphère modifiée) car les informations sur la croissance des STEC dans ces produits sont manquantes. Enfin d'autres modes de cuisson mériteraient d'être étudiés, notamment les modes de cuisson pratiqués en restauration hors foyer (dont le double gril) ainsi que l'effet de plusieurs retournements du steak lors de la cuisson. Dans cette étude, au niveau mathématique, les diverses sources de variabilité ont été prises en compte (variabilité inhérente aux phénomènes biologiques, à la diversité des consommateurs, ...), mais pas les sources d'incertitudes qui étaient supposées avoir un impact beaucoup plus faible.

L'identification de ces limites suggère donc quelques pistes de travaux d'études et de recherche qui mériteraient d'être entrepris dans une perspective d'optimisation de l'estimation du risque notamment *via* la collecte de données :

- sur les pratiques et les charges microbiennes de façon à mieux connaître les facteurs influant la contamination par les STEC ainsi que les données sur le niveau de contamination des fèces, des cuirs, des carcasses et de la viande par des STEC, en situation normale d'élevage, d'abattage et de transformation, en prenant en considération l'ensemble des sérotypes ;
- relatives aux diverses manifestations de la maladie, notamment lors d'épidémies, afin d'avancer dans la connaissance des relations dose-réponse ;
- relatives à la consommation (portion, cuisson, mode de préparation etc.) qui soient directement exploitables dans le cadre d'une appréciation quantitative des risques.

PROTOCOLE ENQUETEUR

Pour vous aider à réaliser l'enquête, nous vous proposons ce protocole et mettons à votre disposition un « **questionnaire type** » qui sera à remplir avec la personne enquêtée. A chaque prise de contact avec une personne (acceptation de l'enquête ou refus), vous devrez remplir les cases correspondantes.

1- Présentation de l'enquêteur et objectifs de l'enquête

Une présentation sommaire de l'enquête semble nécessaire pour créer une bonne communication entre l'enquêteur et les enquêtés ainsi qu'une relation de confiance. En plus de l'**objectif de l'étude**, il peut être important de préciser que le recueil des données assure l'**anonymat** pour les enquêtés car aucune donnée nominative ou personnelle ne sera recueillie à l'issue de ce questionnaire.

L'Afssa met à votre disposition des plaquettes de présentation à remettre à l'enquêté ainsi que des posters et des jeux de cartes destinés à faire connaître l'Afssa et la nutrition aux enfants.

Pendant la présentation de l'étude, il est conseillé de montrer la planche photo (guide des niveaux de cuisson) pour que l'enquêté identifie rapidement le produit.

2- Critères d'inclusion/exclusion :

-La première question est de demander à l'enquêté (enfant ou accompagnant pour les enfants de moins de 6 ans) :

Acceptez vous de participer à l'enquête ?

si non, pourquoi ? (*Exemples de motifs de refus : ne consomme pas de steak haché, nous sommes végétariens, je ne cuisine pas pour l'enfant, ce n'est pas mon enfant*)

si oui, participez-vous à la préparation des repas à la maison ? O/N (en cas de réponse négative demander si la personne se sent apte à répondre à des questions concernant les aliments préparés et consommés au domicile, il conviendra de rapprocher les réponses données avec l'identité du répondant – père, mère, autre...)

3- Méthodologie à appliquer en fonction de l'âge de l'enfant :

-Enfants de moins de 6 ans (crèches, écoles maternelles) :

Il convient de s'adresser à l'un des parents de l'enfant (père ou mère ou autre, à préciser sur le questionnaire) pour recueillir son accord et les informations escomptées. Il sera également possible de s'adresser à l'agent spécialisé des écoles maternelles (ADSEM) pour les données relatives à la cuisson à la cantine.

-Enfants de 6 à 10 ans (écoles primaires) :

Ces enfants étant la plupart du temps accompagnés et/ou recherchés à l'école, il convient en premier lieu de se présenter à l'adulte les accompagnant, d'obtenir son accord pour ensuite questionner l'enfant.

-Enfants de plus de 10 ans (collèges) :

La question peut être posée directement à l'enfant.

4- Points particuliers :

Fratrie :

Dans le cas d'une fratrie, un questionnaire par enfant devra être rempli.

Délégation :

Le membre du GT (enquêteur) peut déléguer la mise en œuvre des questions à une personne de confiance (professeur des écoles par exemple). Cependant il faudra veiller à bien expliquer le protocole, l'objectif et le matériel d'enquête à la personne chargée de recueillir les informations. Par ailleurs, il faudra indiquer cette délégation sur le questionnaire (NUM3).

Questionnaire collectif :

Ne pas procéder à un questionnaire collectif comme par exemple de remettre des questionnaires à plusieurs enfants en même temps pour qu'ils le remplissent chacun de leur côté.

Recrutement sur le lieu de travail :

Le recrutement sur le lieu de travail est possible mais seulement en derniers recours. Dans ce cas, il faudra également l'indiquer sur le questionnaire (Q1).

NB : d'une manière générale, il conviendra, dans la mesure des possibilités, de faire l'enquête à la sortie des classes en semaine mais également le samedi (pour éviter d'exclure de l'enquête la population des enfants restant en garderie ou en études après les cours).

ATTENTION : la question Q10-A et Q10-C est à poser uniquement aux enfants de plus 6 ans

Questionnaire sur les habitudes de cuisson du steak haché de bœuf

NUM1. Numéro de l'enquêteur : I _ I _ I

NUM2. N° du questionnaire I _ I _ I

NUM3. Délégation : NON I _ I OUI I _ I

RECRUTEMENT

1.1.1.1 Q1. Mode de recrutement

Collègues	Ecole	Anniversaire	Kermesse	Autre
1	2	3	4	5
				<i>Q1-A. Préciser :</i>

	Oui	Non
Q2 . Acceptez-vous de participer à l'enquête?	1 (aller à Q3)	2 (aller directement à Q5 et STOP QUESTIONNAIRE)
Q3 .Participez-vous à la préparation des repas ?	1 (présenter questionnaires et photos)	2 (aller à Q4)
Q4 . Savez-vous à quel niveau de cuisson sont préparés les steaks hachés consommés par l'enfant ?	1 (présenter questionnaires et photos)	2 (STOP QUESTIONNAIRE)
Q5. Motif(s) de non participation :		

Données générales sur l'enquêté :

Q6- Département de résidence : I _ I _ I

Q7-Age de l'enfant : I _ I _ I, I _ I ans

(si l'enfant à moins de 6 ans, poser la question Q8, sinon aller directement à Q9)

Q8- Etes-vous : *(entourer la réponse)*

Mère	Père	Autre <i>(passer à Q8-A)</i>
1	2	3

→ Q8-A. Préciser :

Q9-Sexe de l'enfant : F I _ I M I _ I

Consommation

Q10- En t'aidant des photos présentées, quelle est celle qui ressemble le plus au steak haché :

Q10-A. ... que tu aimerais manger ?

(ATTENTION : QUESTION A POSER UNIQUEMENT AUX ENFANTS DE PLUS DE 6 ANS)?

Photo	A	B	C	D	Ne sait pas
-------	---	---	---	---	-------------

Q10-B. ... que tu manges à la maison

Photo	A	B	C	D	Ne sait pas
-------	---	---	---	---	-------------

Q10-C. ... que tu manges à la cantine

(ATTENTION : QUESTION A POSER UNIQUEMENT AUX ENFANTS DE PLUS DE 6 ANS QUI DEJEUNENT A LA CANTINE)?

Photo	A	B	C	D	Ne sait pas
-------	---	---	---	---	-------------

Enquête sur les habitudes de cuisson du steak haché de bœuf

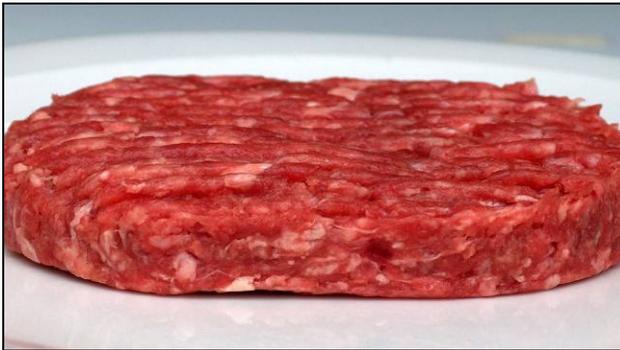


Photo A



Photo B



Photo C



Photo D

Maisons-Alfort, le

NOTE

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relative à la surveillance de la contamination par *Escherichia coli* STEC dans la filière de production des viandes hachées

LA DIRECTRICE GENERALE

Par courrier reçu le 22 décembre 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 16 décembre 2005 par la Direction générale de l'alimentation d'une demande d'appui scientifique et technique relative à la surveillance de la contamination par *Escherichia coli* STEC dans la filière de production des viandes hachées.

L'expertise a été réalisée par les membres du groupe de travail « STEC AQR » renforcé pour l'occasion par un expert du laboratoire de l'Afssa de Maisons-Alfort (Lerqap) pour ce qui concerne les techniques de laboratoire.

Le produit de l'expertise a été validé par les experts du Comité d'experts spécialisé Microbiologie lors de la réunion du 14 février 2006.

1. Contexte de la demande d'appui scientifique et technique

L'objectif de la demande d'appui scientifique et technique est de définir un plan de surveillance qui permettrait de recueillir des données de prévalence utilisables dans le cadre de l'évaluation du risque pour le germe pathogène *Escherichia coli* STEC.

Cette demande cible plus spécifiquement quatre domaines de réflexion. Il s'agit :

- « a- Du champ de la surveillance au regard de la connaissance actuelle sur la pathogénicité des STEC et au regard des techniques de laboratoire existantes ;
- b- Des méthodes d'analyse à préconiser aux opérateurs et aux services de contrôles ;
- c- Des méthodes d'échantillonnage envisageables et leur valeur statistique attendue ;
- d- De la définition d'un lot (mêlée, journée de fabrication, ...) pour la gestion d'un résultat d'analyse défavorable. »

2. Expertise

a- Champ de surveillance au regard de la connaissance actuelle sur la pathogénicité des STEC et au regard des techniques de laboratoires existantes.

En ce qui concerne le champ d'application de la surveillance, les experts estiment que limiter le plan de surveillance aux viandes hachées préparées à la demande en boucherie artisanale n'est pas pertinent, et qu'il serait souhaitable, compte tenu du contexte (épidémie d'infections à *E. coli* O157:H7 dans le Sud-Ouest, en octobre 2005) de réaliser le plan de surveillance sur les viandes hachées industrielles surgelées. Ceci serait d'autant plus pertinent si le plan de surveillance était accompagné de mesures de gestion.

En ce qui concerne les souches STEC à rechercher :

- les données épidémiologiques disponibles montrent (i) que la plupart des cas de SHU (syndrome hémolytique urémique) sont dus à *E. coli* O157:H7, (ii) que plus de la moitié des cas de SHU chez l'enfant de moins de 15 ans en France seraient dus à O157:H7 (les souches O157 représentent 71% des souches isolées, et des anticorps anti-O157 sont présents dans 57% des cas) (1). Ces données sont similaires à celles disponibles dans d'autres pays d'Europe ou aux Etats-Unis (2) ;
- il est préférable d'utiliser pour le plan de surveillance des protocoles validés et si possible normalisés (ce qui n'est le cas à l'heure actuelle que pour *E. coli* O157 :H7) (2).

Les experts proposent *a minima* de rechercher de façon systématique *E. coli* O157 :H7 possédant les gènes de virulence *stx*₁ et/ou *stx*₂ associé(s) au gène *eae*.

Une vision plus exhaustive de la situation serait obtenue par utilisation, en parallèle de la recherche de O157 :H7, de méthodes PCR ciblées sur les gènes *stx* puis *rfb* (codant les antigènes somatiques), et couplées à une immuno-concentration (lorsque les outils sont disponibles). Ceci permettrait l'isolement des souches appartenant aux principaux sérogroupes autres que O157 isolés en clinique humaine (O26, O103, O111, O145, O55, O91). Quoiqu'il en soit, la vérification de la présence des gènes *stx* et *eae* dans les souches isolées est indispensable pour pouvoir envisager des mesures de gestion.

Dans l'idéal le Groupe de travail estime qu'il faudrait rechercher tous les STEC selon la méthode d'analyse définie pour le plan de surveillance de la DGAI sur la contamination par *Escherichia coli* STEC dans les fromages au lait cru de chèvre. Cependant, il est important de noter qu'il ne sera pas possible d'envisager des mesures de gestion systématiques suite à la détection d'une souche STEC n'appartenant à aucun des sérogroupes cités ci-dessus dans de la viande hachée. En effet, le rôle pathogène de telles souches n'est pas définitivement établi et peut être contesté.

b- Méthodes d'analyse à préconiser aux opérateurs et aux services de contrôles

En préambule, il convient de souligner que la manipulation de *E. coli* O157 :H7 nécessite un laboratoire de type P3*. Toutefois, les laboratoires manipulant des matières au sujet desquelles il existe des incertitudes quant à la présence d'agents biologiques pouvant occasionner une maladie chez l'homme mais qui n'ont pas pour objectif de travailler avec des agents biologiques en tant que tels doivent adopter au moins le niveau de confinement 2¹.

Détection des STEC non O157

Concernant la surveillance de la contamination des viandes hachées par les STEC, une première étape de ciblage des échantillons vis à vis des gènes *stx* sera réalisée. Dans ce contexte, la méthode d'analyse définie pour le plan de surveillance de la contamination par *Escherichia coli* STEC dans les fromages au lait cru de chèvre pourra être utilisée. Les échantillons positifs seront ensuite analysés en utilisant les méthodes PCR décrites dans la littérature et qui ciblent les gènes impliqués dans la biosynthèse des antigènes somatiques suivants : O26, O55, O91, O103, O111, O145. Dans les cas où l'échantillon est à la fois positif pour *stx*(s) et correspond à un des sérogroupes cité ci-dessus, un isolement spécifique de la souche sera entrepris. Pour cela, lorsque c'est possible, les techniques d'immuno-séparation magnétique (IMS) seront utilisées. De tels tests sont commercialisés en France par la société Dynal excepté pour les sérogroupes O55 et O91. Les souches isolées pourront alors être précisément caractérisées vis à vis de leurs facteurs de virulences (gènes *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *hly*_a, etc.).

Détection de *Escherichia coli* O157 : H7

Au niveau international, la norme EN ISO 16 654 pour la recherche d'*E.coli* O157 met en œuvre un enrichissement en milieu mTSB additionné de novobiocine et implique une étape de séparation immuno-magnétique.

¹ Article 16 de la Directive 200/54/CE du parlement européen et du conseil du 18 septembre 2000

A ce jour, en France, le seul test validé AFNOR pour la détection de l'antigène O157 est le test Vidas *E.coli* O157 (ECO) de la société bioMérieux. Une immuno-concentration est réalisée lorsque le premier test Vidas ECO est positif (test Vidas ICE). D'autres tests sont à ce jour validés dans d'autres pays (validation AOAC...) mais le groupe de travail ne peut pas se prononcer sur les performances de ces tests sans avoir pu étudier les dossiers de validation attestant de leur performance.

Pour la recherche spécifique du sérotype O157, la méthode validée AFNOR pourra être mise en oeuvre. L'absence de détection de l'antigène O157 permet de dire qu'*E. coli* O157 n'est pas présent dans la prise d'essai. Par contre, l'obtention d'un signal positif ne signe pas la présence systématique d'*E. coli* O157 dans l'aliment. En effet, avec ce test, de même que pour l'ensemble des tests immuno-enzymatiques actuellement commercialisés pour détecter ce pathogène, des réactions croisées peuvent se produire. Ainsi, avec certaines souches possédant l'antigène O157, des résultats faussement positifs peuvent être observés (certaines *Salmonella* et certains *Citrobacter*, par exemple). Pour infirmer ou confirmer la présence d'*E. coli* O157, il faudra donc toujours identifier la bactérie cible après l'avoir isolée sur des géloses spécifiques. Une étape d'immuno-concentration de la bactérie cible (par IMS ou VIDAS ICE) à partir des bouillons positifs est alors fortement conseillée afin de concentrer les *E. coli* O157 avant isolement et éviter ainsi des faux négatifs (colonies suspectes difficiles à repérer du fait d'un grand nombre de colonies sur les boîtes).

Dés lors que des colonies suspectes sont repérées sur les milieux gélosés utilisés, il faudra procéder à une étape de confirmation en :

- vérifiant par agglutination de la présence de l'antigène somatique O157 et H7 après s'être assuré que les souches n'étaient pas auto-agglutinantes ;
- identifiant l'espèce *E. coli* ;
- recherchant des gènes *stx* et *eae* par PCR.

Sont considérées comme pathogènes les souches STEC du sérotype O157:H7 et des sérogroupes O26 , O111, O145 et O103 ayant comme facteurs de virulence les gènes *stx1* et/ou *stx2*, et *eae*.

c-Méthodes d'échantillonnage envisageables et leur valeur statistique attendue

L'hypothèse de départ retenue par les experts est de se placer dans le cadre d'une évaluation de la prévalence au niveau national et non d'une définition de plans d'autocontrôle. A ce propos, les experts n'ont délibérément pas répondu à la question relative aux auto-contrôles qui devraient être mis en place par les industriels. Cette question fera l'objet d'une réflexion menée ultérieurement (automne 2006) par un groupe de travail qui prendra la suite du groupe de travail « STEC AQR ».

Si l'objectif est d'obtenir la meilleure estimation possible de la prévalence au niveau national, l'échantillonnage doit être le plus représentatif possible et il convient donc de ne considérer qu'un seul prélèvement par lot de viande haché. Par contre, dans la limite des contraintes techniques, il pourra être envisagé une augmentation de la prise d'essai par steak haché de 25 g (prise habituelle) jusqu'à la totalité du steak.

Données sur la prévalence :

D'après les données françaises publiées en 2002 par Vernozzy-Rozand *et al.* (Lett. Appl. Microbiol.), la prévalence de *E. coli* O157:H7 serait de l'ordre de 1‰ dans la viande hachée de boeuf. Ce chiffre est cohérent avec les données publiées pour la Belgique en 2005 (Chahed *et al.*, Eurosurveillance) et pour l'Italie en 2004 (Conedera *et al.*, Int. J. Food Microbiol.). Par contre une publication irlandaise de Cagney *et al.* (Food Microbiol., 2004) rapporte une prévalence plutôt de l'ordre de 1%.

Si on se base sur le chiffre de 0,001 et sur l'effectif envisagé dans la demande de 1 000 analyses, en supposant que le plan de surveillance soit ciblé sur *E. coli* O157:H7 :

- en obtenant un seul prélèvement positif (cas probable), on aura un intervalle de confiance à 95% sur le résultat de [0,025 ‰ ; 5,5 ‰].

- en n'obtenant aucun prélèvement positif, on pourra dire avec une confiance de 95% que la prévalence est inférieure à 4,7‰. La probabilité de se trouver dans un tel cas (0 prélèvement positif) avec une prévalence théorique de 1 ‰ est de 37%.

Si le but est de mettre en évidence par un test statistique une augmentation de la prévalence par rapport à celle reportée en 2002 (en supposant que les études seront comparables), il peut être intéressant de noter qu'il faudrait avoir une prévalence dépassant 1% pour avoir 90% de chances de détecter une augmentation par un test statistique réalisé avec un risque de première espèce de 5% (valeur classique).

Enfin les intervalles de confiance que l'on obtiendrait en augmentant l'effectif sont :

- [0,32 ‰ ; 2,3 ‰] avec 5 positifs sur 5 000 ;
- [0,48 ‰ ; 1,8 ‰] avec 10 positifs sur 10 000.

Par ailleurs, avec un effectif de 5 000, on pourra montrer une augmentation significative de la prévalence (par rapport à l'étude de 2002) avec une probabilité de 90% si cette prévalence dépasse 4 ‰.

Représentativité

En premier lieu, il conviendrait de ne pas limiter le plan de surveillance aux steaks hachés à la demande et inclure également les steaks hachés industriels. En effet, la viande hachée achetée à la demande chez le boucher n'est pas représentative de la consommation de steaks hachés en France. En effet, selon les estimations fournies par les données d'achat des ménages de l'enquête SECODIP (2001), qu'il s'agisse de steaks hachés frais préemballés ou de steak hachés surgelés, plus de 90% des achats des ménages s'effectuent en hypermarché et supermarché. Pour les steaks hachés frais, 0,5% s'achètent chez les bouchers.

D'autre part, le plan de sondage dépendra de l'objectif du plan de surveillance.

- 1- Si l'objectif est la surveillance des steaks hachés produits par des bouchers détaillants, la méthode d'échantillonnage proposée dans la demande est adaptée, à savoir la pondération du nombre de prélèvements par département en fonction du nombre de bouchers détaillants.
- 2- Si l'objectif vise à estimer la prévalence de la contamination des steaks hachés consommés au niveau national, la méthode citée ci-dessus n'est pas pertinente. En effet, ce produit est en grande partie acheté en grande surface et la présence en grand nombre de bouchers détaillants est davantage le reflet d'un mode d'approvisionnement particulier.

Pour assurer une meilleure représentativité, il serait plus pertinent de pondérer le nombre de prélèvements par le nombre d'habitants dans chaque département. Ces calculs peuvent être affinés en tenant compte des tranches d'âge.

d- Définition d'un lot (mêlée, journée de fabrication...) pour la gestion d'un résultat d'analyse défavorable. Il paraît d'ailleurs opportun d'élargir la question aux principaux germes d'intérêt pour la sécurité sanitaire de la viande hachée.

Prélèvements pour la surveillance chez les bouchers détaillants :

Dans les établissements de commerce de détail, la suggestion de pondérer le nombre de prélèvements par le nombre de boucheries du département semble appropriée (voir plus haut).

Prélèvements pour la surveillance chez les fabricants et distributeurs

Il semble approprié de pondérer le nombre de prélèvements par le tonnage produit ou distribué (voir plus haut).

Définition du lot pour la gestion des résultats d'une analyse défavorable

Au niveau des bouchers détaillants

Un lot correspond à la viande hachée par un hachoir donné entre deux nettoyages/désinfection de celui-ci.

Au niveau des fabricants

Le lot est défini par le règlement 2073/2005 relatif aux critères microbiologiques. C'est la responsabilité de l'exploitant de définir précisément ce qu'il entend par « des conditions pratiquement identiques », dans le respect des obligations fixées par le règlement 178/2002 en matière de sécurité et de traçabilité.

Toutefois, il est recommandé qu'un lot ne soit pas plus grand que la quantité de viande hachée produite par une ligne de fabrication donnée entre deux nettoyages/désinfection.

Pour un lot défini de façon plus restrictive par l'exploitant, en cas de présence de STEC ou de non respect d'un critère microbiologique du règlement 2073/2005, il est recommandé de gérer comme un seul et même lot l'ensemble de la production entre deux nettoyages de la ligne de fabrication concernée.

Au niveau des distributeurs

La deuxième recommandation ci-dessus s'applique, c'est-à-dire qu'il est recommandé de gérer comme un seul et même lot l'ensemble de la production entre deux nettoyages de la ligne de fabrication concernée.

3. Éléments complémentaires :

Sont placés en annexe de cette note :

-un logigramme concernant les méthodes d'analyse en vue d'améliorer la lisibilité pour les opérateurs intéressés (annexe 1) ;

-une fiche de synthèse relative aux méthodes d'analyse et à leur mise en œuvre (annexe 2).

Références

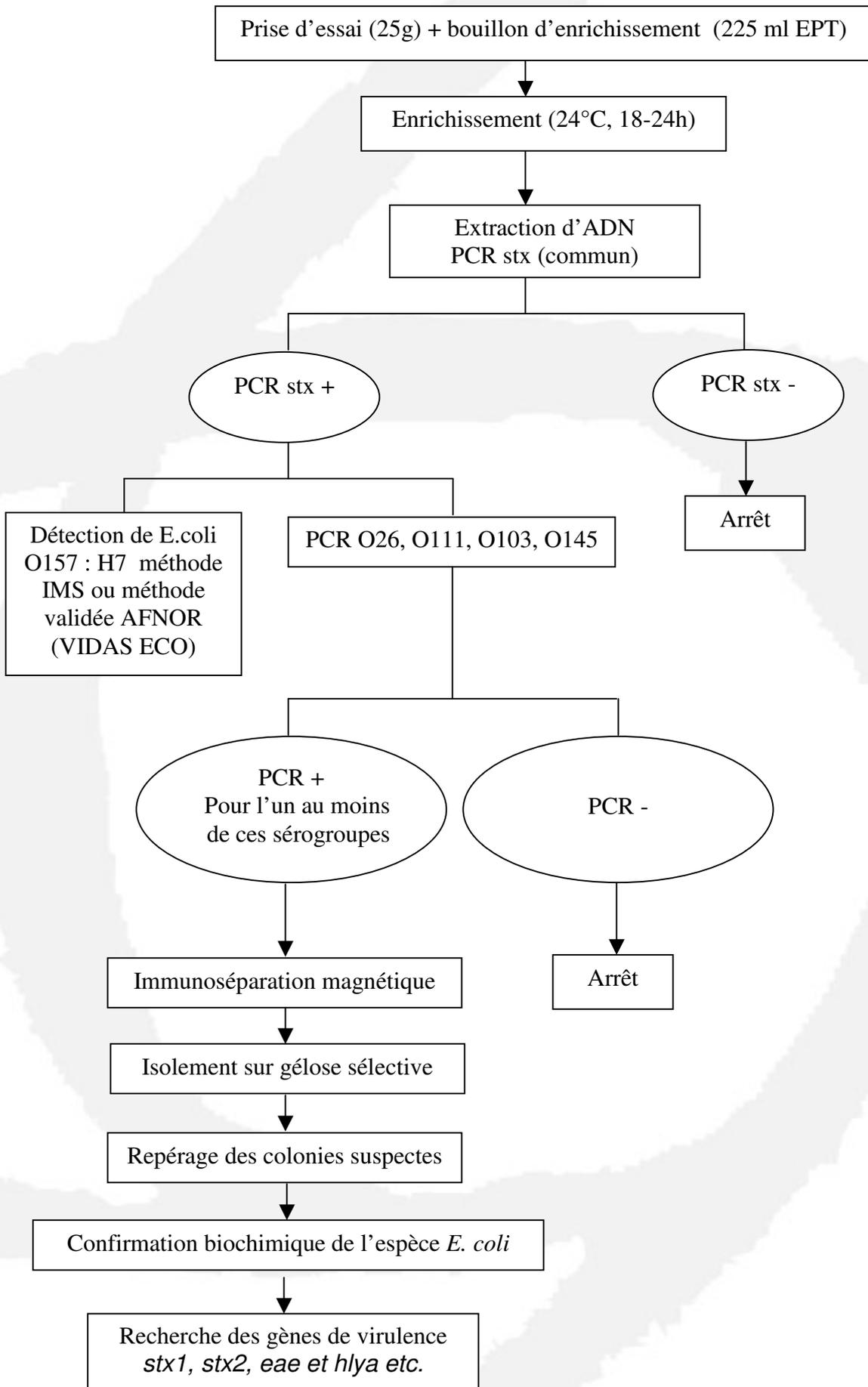
1- Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France(2001-2003) :

http://www.invs.sante.fr/publications/2005/snmi/pdf/syndrome_hemolytique_uremique.pdf

2- Groupe de Travail STEC de l'AFSSA. 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).

<http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/16054-22454.pdf>

Annexe 1 : LOGIGRAMME (détection des STEC)



Annexe 2 : Section F extraite du rapport « bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) » – avril 2003

Isolement et Identification des STEC

Points à retenir

- Les STEC n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sélectif sur un milieu de culture particulier. Leur recherche nécessite d'avoir recours à la PCR (Polymerase chain reaction) avec utilisation d'amorces spécifiques des gènes *stx* codant la production de vérotoxines ;
- A l'opposé, la majeure partie des souches de *E. coli* O157:H7 ne fermente pas le sorbitol et ne produit pas de β -glucuronidase, ce qui permet l'utilisation de milieu dédié comme le SMAC (Sorbitol Mac Conkey Agar) ;
- En France, il existe une méthode validée AFNOR et une norme ISO pour l'aliment et le sérotype O157:
 - IMS-Dynal, reprise dans la norme ISO EN-16654, qui est la méthode de référence en Europe,
 - Vidas- bioMérieux ;
- La méthode recommandée par le groupe de travail de l'Afssa pour la confirmation des colonies suspectes STEC O157 devrait intégrer l'ensemble des étapes suivantes :
 - vérification par agglutination de la présence de l'antigène somatique O157
 - identification de l'espèce *E. coli*
 - recherche des Shigatoxines par ELISA ou recherche des gènes *stx* et *eae* par PCR : cette dernière recherche est recommandée (absence de faux négatif).
- Tout travail de recherche sur les souches de STEC nécessite un laboratoire de type P3*.
- De nombreux travaux sont en cours actuellement pour développer des méthodes de détection d'autres sérotypes : O26, O103, O145 et O111 et pour améliorer les méthodes génétiques existantes.

Question n°26 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et la détection des STEC dans les aliments ?

Cf. rapport page 105.



Maisons-Alfort, le 7 novembre 2006

NOTE

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relative à l'évaluation de la contamination par *Escherichia coli* O157 :H7 dans la filière de production des viandes hachées

Par courrier en date du 11 octobre 2006, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie par la Direction générale de l'alimentation d'une demande d'appui scientifique et technique relative à l'évaluation de la contamination par *Escherichia coli* STEC dans la filière de production des viandes hachées.

Au regard du délai de réponse demandé, l'expertise a été réalisée par les membres du groupe de travail menant une analyse quantitative du risque sur les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), et n'a pas fait l'objet d'une présentation ni d'une validation du Comité d'experts spécialisé Microbiologie. Par ailleurs, il convient de noter que le domaine d'expertise de la présente note est ciblé sur *Escherichia coli* O157 :H7.

I- Contexte de la demande d'appui scientifique et technique

L'objectif de la demande d'appui scientifique et technique est de proposer un protocole permettant de mettre en œuvre une quantification de la contamination des viandes hachées.

Cette demande cible plus spécifiquement trois axes de réflexion. Il s'agit :

- *Du risque de survenue de cas humains : Les travaux sur le point d'aboutir du groupe de travail « STEC AQR » permettent-ils d'informer dès à présent des seuils de contamination susceptibles de déboucher sur la survenue de cas épidémiques ou de cas sporadiques ?*

- *Des éléments d'évaluation du niveau de contamination de la production : En cas de résultat positif, le professionnel est amené à évaluer l'ampleur de la contamination de sa production. En effet, en fonction du procédé de fabrication mis en œuvre et des modalités d'utilisation des matières premières, il peut être amené à faire le tri entre différents lots, sous-lots, mêlés, journées de production*

Les plans d'échantillonnage actuellement utilisés pour recherche de présence/ absence de type n=30 ou n=60 pourraient-ils être remplacés par d'autres modalités d'échantillonnage associées à des méthodes de quantification de type nombre le plus probable ?

- *Du contrôle des matières premières : Quelles modalités d'échantillonnage pourraient être utilisées sur le minéral, dans un contexte de qualification des fournisseurs, de contrôle à réception voire de remplacement du contrôle en routine des produits finis par celui des matières premières ?*

Préambule

Les experts du groupe de travail souhaitent confirmer la définition du lot proposée dans la note du 18 avril 2006¹. Cette définition considère le lot dans sa globalité. A aucun moment il n'a été recommandé que des mêmes mesures de gestion s'appliquent à tout le lot, dès lors que des sous-parties de ce lot sont identifiées.

De plus, pour répondre au mieux aux questions de la saisine, les experts auraient souhaité voir apparaître un objectif général de santé publique fixé par l'administration (ex : éviter les SHU épidémiques, éviter les SHU sporadiques). Il est également noté qu'aucun élément concernant les contraintes et conditions de réalisation des plans d'échantillonnage n'est indiqué.

II- Expertise

1- Risque de survenue de cas humains :

Concernant le risque de survenue de cas humains, les membres du groupe de travail précisent qu'il est nécessaire que l'analyse quantitative du risque soit entièrement finalisée pour pouvoir apporter des éléments de réponse. Une réponse à cette question pourra être apportée à la fin du mois de décembre 2006.

2- Eléments d'évaluation du niveau de contamination de la production : modalités d'échantillonnage

Considérations générales :

En cas de résultat d'autocontrôle positif sur une mûlée, le professionnel est amené en premier lieu à évaluer le niveau de contamination de cette mûlée identifiée comme contaminée. L'objectif de ces contrôles complémentaires est de pouvoir éliminer l'hypothèse d'une contamination suffisante à l'apparition de cas cliniques.

Plusieurs cas se présentent :

*Si tous les échantillons prélevés sur cette mûlée se révèlent positifs, cette hypothèse de contamination à un niveau très élevé ne pourra pas être éliminée. Dans ce cas de figure, l'industriel devrait mettre en œuvre des contrôles visant à déterminer l'étendue de la contamination des produits avec des investigations sur les matières premières dont est issue la mûlée contaminée. Il s'agira également de contrôler les autres mûlées fabriquées pour partie avec le minerai contaminé.

*Si des échantillons analysés issus de la mûlée contaminée donnent des résultats négatifs (pas de détection de *E. coli* O157:H7 pathogène, cf. note de l'Afssa du 18 avril 2006), les deux mûlées situées chronologiquement avant et après la mûlée contaminée devraient faire l'objet du même plan d'échantillonnage que la mûlée contaminée. Il faudrait également contrôler les minerais dont est issue la mûlée contaminée conformément au plan d'échantillonnage proposé dans la partie III.

L'objectif du contrôle de la mûlée en amont de celle contaminée est de vérifier si l'apport du minerai contaminé a pu se faire en amont. Si cette mûlée « amont » est contaminée (au moins un échantillon positif), il faudrait continuer les investigations sur les mûlées précédentes jusqu'à ne plus trouver d'échantillon positif en utilisant pour chaque mûlée, objet du contrôle renforcé, le même plan d'échantillonnage que celui utilisé pour la mûlée contaminée lors de l'autocontrôle.

¹ Note de l'Afssa relative à la surveillance de la contamination par *Escherichia coli* STEC dans la filière de production des viandes hachées en date du 18 avril 2006.

*Si dans cette cascade de contrôles renforcés en amont de la production de la mûlée détectée contaminée, tous les échantillons analysés d'une mûlée étaient positifs, on se retrouverait dans le premier cas évoqué ci-dessus exigeant des investigations lourdes incluant la matière première et éventuellement des mûlées fabriquées à partir de la mûlée contaminée. En ce qui concerne la mûlée suivante, il s'agira de vérifier qu'elle n'a pas été contaminée par la mûlée détectée positive par l'intermédiaire du hachoir. Si cette mûlée suivante s'avère elle aussi contaminée, il conviendra d'appliquer aussi le plan d'échantillonnage à la mûlée suivante et ainsi de suite en aval jusqu'à aboutir à une mûlée ne donnant aucun échantillon positif.

Objectifs :

Le plan d'échantillonnage mis en place sur chaque mûlée devra être suffisamment important en nombre de prélèvements afin :

- 1) de permettre de détecter de faibles niveaux de contamination et ;
- 2) de permettre d'estimer par la méthode du nombre de plus probable le niveau de contamination dans une gamme suffisamment large de concentrations.

Si l'on privilégie le premier objectif, il semble raisonnable de choisir un plan d'échantillonnage sans dilution. L'utilisation de dilutions aurait pour seul avantage de permettre la quantification de plus forts niveaux de contamination ce qui n'apparaît pas comme prioritaire face au premier objectif.

Echantillonnage :

Le tableau 1 mis en annexe de ce document indique des estimations par la méthode du nombre de la concentration la plus probable dans une mûlée à partir de l'analyse de 30 échantillons de 25 grammes chacun. Le 1^{er} échantillon analysé (celui ayant servi à identifier la mûlée positive) doit être considéré comme 1 des 30 échantillons de sa mûlée.

Considérons un plan d'échantillonnage consistant i) à prélever n échantillons de masse m (en grammes) dans chaque mûlée investiguée et ii) à analyser chaque échantillon indépendamment. L'estimation de la concentration la plus probable dans la mûlée ne peut être réalisée que si l'on peut supposer la répartition de la contamination homogène dans la mûlée. Cette hypothèse est tout à fait recevable compte tenu des temps de pré-hachage et hachage opérés (Reinders *et al.*, 2003).

Dans ce cas de répartition homogène du pathogène dans la viande hachée, la distribution du nombre de cellules du pathogène dans la masse m est décrite par une loi de Poisson de moyenne $C \times m$, C représente la concentration dans la mûlée en cellules par gramme. A partir de cette loi on peut calculer la probabilité p_- qu'un échantillon soit négatif : $p_- = \exp(-C \times m)$. Si on obtient un nombre k d'échantillons positifs compris entre 1 et $n-1$, on peut estimer simplement la concentration la plus probable par $\hat{C} = -\ln(1 - k/n)/m$.

Pour $n = 30$ et $m = 25g$, on voit dans le tableau 1 qu'un plan d'échantillonnage de 30 fois 25 grammes permet de quantifier la concentration dans la mûlée dans une gamme allant environ de 0,001 à 0,1 cellule par gramme.

Néanmoins il est important de garder en tête l'incertitude liée à cette estimation et à une classification à partir du nombre d'échantillons positifs. Si on nomme X le nombre d'échantillons positifs parmi les n analysés, on peut calculer pour une concentration C donnée dans la mûlée la probabilité associée à chaque valeur possible de X : $\Pr(X = k) = C_n^k (1 - p_-)^k p_-^{n-k}$. On peut donc aussi calculer la probabilité d'obtenir au moins k positifs:

$\Pr(X \leq k) = \sum_{y=0}^k C_n^y (1 - p_-)^y p_-^{n-y}$. Le tableau 2 reporte cette dernière probabilité calculée pour

diverses concentrations C dans la mûlée et diverses valeurs possibles de k . Ainsi on voit par exemple dans la première colonne qu'une mûlée contaminée à 0,01 cellule par gramme n'aura

qu'une probabilité de 0,1% de ne présenter aucun positif sur 30 échantillons alors qu'une mûlée contaminée à 0,001 cellule par gramme aura une probabilité de 47,2% de ne présenter aucun positif sur 30 échantillons. Si l'on accepte un risque d'erreur de 5% (risque de se tromper en affirmant que la concentration de la mûlée est inférieure à un tel seuil), on peut dire qu'une mûlée ne présentant aucun échantillon positif sur 30 a une concentration inférieure à 0,004 cellule par gramme. De même on pourra dire avec un risque d'erreur de 5% qu'une mûlée présentant 5 positifs sur 30 par exemple a une concentration inférieure à 0,02 cellule par gramme. Le tableau 2 permet donc en quelque sorte d'avoir une borne d'incertitude par excès sur la concentration estimée dans le tableau 1, en regardant la valeur de concentration correspondant à la cellule encadrée dans chaque colonne.

Au plan d'échantillonnage qui préconise de prendre 30 échantillons de 25 g chacun pour faire 30 analyses, on pourrait substituer un protocole allégé d'analyses visant à prendre également 30 échantillons de 25 g chacun puis à regrouper (« pooler ») par 3 les échantillons de 25 g pour constituer des échantillons composites de 75 g soumis à l'analyse. On réduit ainsi par 3 le nombre d'analyses. La limite de détection de l'analyse est identique (Vimont A. *et al.* 2006) mais par contre la gamme des niveaux quantifiables est diminuée (cf. tableaux 3 et 4).

3- Contrôle des matières premières

Quelles modalités de prélèvement pourraient être utilisées sur le minerai, dans un contexte de qualification des fournisseurs, de contrôle à réception ou d'évaluation de matières premières suite à un contrôle positif sur des produits finis ?

Le contrôle des minerais est une approche complémentaire et pertinente pour la maîtrise de *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée. Ce contrôle est important lors de procédures renforcées pour évaluer l'étendue et l'importance de la contamination des viandes quand le pathogène a été détecté dans une mûlée. Il permet aussi dans le cadre d'autocontrôles, de vérifier la matière première (les minerais) entrant dans l'atelier (en complément des exigences incluses dans le cahier des charges « Fournisseur » qui doit prendre en compte ce pathogène).

Les industriels de la filière viande hachée utilisent des protocoles d'échantillonnage extrêmement variés. Aux États-Unis, une des approches les plus communément utilisées consiste à subdiviser 20 tonnes de minerais en 4 sous-lots de 5 tonnes chacun. Cinq prélèvements de 75 g chacun sont réalisés dans chacun des sous lots. Les échantillons regroupés, d'un poids de 375 g, sont ensuite analysés. Ainsi 4 analyses portant sur une masse totale de 1500 g sont réalisées pour qualifier le lot de 20 tonnes de minerais.

Cette stratégie de « pooling » exige d'avoir vérifié au préalable la limite de détection de la méthode qui doit être capable de détecter une cellule de *E. coli* O157:H7 dans 375 g de minerais. A notre connaissance, aucune étude publiée ne permet de s'assurer de la détection de 1 bactérie *E. coli* O157:H7 dans 375 g. L'étude récente publiée par Guerini *et al.* (2006) a été réalisée dans de la viande hachée et ses résultats ne sont pas extrapolables aux minerais (la microflore totale étant supérieure à la surface des morceaux de muscles issus des minerais).

En ce qui concerne les modalités pratiques de réalisation des prélèvements de minerais, deux possibilités existent et sont dictées par l'état du minerai (frais ou congelé). En effet, un minerai congelé rend difficile la réalisation d'excisions de surface du tissu conjonctif sous-cutané et il faut recourir à des appareils de type emporte pièces pour réaliser ces carottages comprenant tissus superficiels et profonds. Dans ce cas de figure, 375 g de minerais correspondraient à environ 200 cm² de tissu à la superficie des morceaux de muscles.

Lorsque le minerai est réfrigéré, les excisions de surface sont possibles et 375 g correspondraient à 60 prélèvements de 15 cm² chacun avec une surface totale excisée de 900 cm² (la contamination des viandes étant superficielle, on peut en déduire que la probabilité de détecter le pathogène est plus importante lorsque les excisions superficielles sont réalisées).

Le plan d'échantillonnage évoqué plus haut ainsi que l'analyse d'échantillons composites de 375 g évoque une validation scientifique avec notamment la vérification de la limite de détection de la

méthode en fonction des modalités de prélèvements envisagées. En l'absence totale de données chiffrées sur la contamination des minerais en France par *E. coli* O157 :H7, il nous est impossible de dire si l'approche états-unienne est pertinente en France.

Pascale BRIAND

Annexes :

Nb d'échantillons positifs (k)	0	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	30
Concentration estimée en cellules par gramme (\hat{C})	NC*	0,001	0,004	0,007	0,011	0,014	0,018	0,023	0,028	0,033	0,040	0,048	0,058	0,072	0,092	0,136	NC

NC : non calculable

Tableau 1. Estimations par la méthode du nombre le plus probable de la concentration dans une mée à partir de l'analyse de 30 échantillons de 25 grammes chacun.

k : nombre d'échantillons positifs sur n = 30 échantillons analysés de m = 25 g chacun																	
C cell.,g⁻¹	0	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	30
1,000	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,900	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,800	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,700	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,600	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,500	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,400	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,300	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,016	1
0,200	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,184	1
0,100	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,009	0,095	0,452	0,923	1
0,090	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,003	0,033	0,204	0,626	0,965	1
0,080	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,015	0,102	0,383	0,792	0,987	1	1
0,070	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,009	0,063	0,257	0,616	0,913	0,997	1	1
0,060	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,008	0,053	0,210	0,517	0,832	0,977	0,999	1	1
0,050	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,011	0,061	0,218	0,504	0,799	0,958	0,997	> 0,999	1
0,040	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,003	0,021	0,096	0,286	0,574	0,831	0,961	0,996	> 0,999	> 0,999	1
0,030	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,010	0,057	0,197	0,451	0,728	0,911	0,982	0,998	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,020	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,007	0,051	0,196	0,460	0,739	0,915	0,982	0,998	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,010	0,001	0,005	0,076	0,320	0,661	0,893	0,979	0,997	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,009	0,001	0,010	0,119	0,420	0,754	0,936	0,990	0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,008	0,002	0,019	0,181	0,532	0,837	0,966	0,996	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,007	0,005	0,035	0,268	0,652	0,904	0,985	0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,006	0,011	0,065	0,383	0,767	0,952	0,994	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,005	0,024	0,117	0,524	0,867	0,980	0,998	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,004	0,050	0,207	0,682	0,940	0,994	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,003	0,105	0,352	0,832	0,981	0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,002	0,223	0,566	0,944	0,997	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,001	0,472	0,831	0,994	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1

Tableau 2. Calcul pour diverses concentrations C dans la mêlée et diverses valeurs possibles de k, de la probabilité que le nombre X d'échantillons positifs parmi 30 échantillons de 25 grammes soit inférieur ou égal à k. Pour chaque valeur de k appar ait encadrée en gras la cellule contenant la plus grande valeur reportée de cette probabilité inférieure ou égale à 5%.

Nb d'échantillons positifs (k)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration estimée en cellules par gramme (\hat{C})	NC*	0,001	0,003	0,005	0,007	0,009	0,012	0,016	0,021	0,031	NC

NC : non calculable

Tableau 3. Estimations par la méthode du nombre le plus probable de la concentration dans une mûlée à partir de l'analyse de 10 échantillons de 75 grammes chacun.

C cell.,g ⁻¹	k : nombre d'échantillons positifs sur n = 10 échantillons analysés de m = 75 g chacun										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1,000	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,900	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,800	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,700	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,600	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,500	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,400	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,300	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,200	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1
0,100	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,006	1
0,090	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,012	1
0,080	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,025	1
0,070	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,051	1
0,060	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,005	0,106	1
0,050	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,022	0,212	1
0,040	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	0,011	0,086	0,400	1
0,030	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	0,015	0,080	0,285	0,672	1
0,020	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	0,011	0,051	0,165	0,393	0,690	0,920	1
0,010	0,001	0,007	0,038	0,130	0,311	0,553	0,779	0,923	0,983	0,998	1
0,009	0,001	0,012	0,061	0,187	0,400	0,645	0,843	0,951	0,991	0,999	1
0,008	0,002	0,023	0,098	0,264	0,501	0,736	0,897	0,972	0,995	> 0,999	1
0,007	0,005	0,041	0,154	0,361	0,612	0,819	0,939	0,986	0,998	> 0,999	1
0,006	0,011	0,074	0,236	0,480	0,724	0,890	0,968	0,994	0,999	> 0,999	1
0,005	0,024	0,131	0,350	0,615	0,827	0,943	0,986	0,998	> 0,999	> 0,999	1
0,004	0,050	0,224	0,498	0,754	0,911	0,976	0,996	0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,003	0,105	0,371	0,673	0,876	0,966	0,993	0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,002	0,223	0,584	0,847	0,961	0,993	0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1
0,001	0,472	0,840	0,969	0,996	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1

Tableau 4. Calcul pour diverses concentrations *C* dans la m \acute{e} lée et diverses valeurs possibles de *k*, de la probabilité que le nombre *X* d'échantillons positifs parmi 10 échantillons de 75 grammes soit inférieur ou égal à *k*. Pour chaque valeur de *k* apparaît encadrée en gras la cellule contenant la plus grande valeur reportée de cette probabilité inférieure ou égale à 5 %.

Références bibliographiques

Guerini MN, Arthur TM, Shackelford SD, Koochmaraie M :Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 growth media for use in test-and-hold procedures for ground beef processing. J Food Prot. 2006 May;69(5):1007-11.

R. Y. MURPHY AND R. A. SEWARD Process Control and Sampling for *Escherichia coli* O157:H7 in Beef Trimmings *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 8, 2004, Pages 1755–1759.

Reinders, R.D., De Jonge, R., Evers, E.G., 2003. A statistical method to determine whether micro-organisms are randomly distributed in a food matrix, applied to coliforms and *Escherichia coli* O157 in minced beef.

Silliker, J.H., and Nickelson, R. 1995. Methods for sampling and Compositing Fresh Red Meat Products for Analysis of Pathogenic and Indicator Bacteria. Final Report to the National Cattlemen's Beef Association (addendum of September 6, 1995). Englewood, CO: National Cattlemen's Beef Association.

USDA's Food Safety and Inspection Service, Federal Register Notice, "*E. coli* O157:H7 contamination of beef products" (October 7, 2002, vol. 67, no. 194, pp 62325-62334).

Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Mallen, B., Bavai, C., Dothal, M., Gleizal, N., Nguon, N., Delignette-Muller, M.L., (2006) Optimization of the enrichment protocol for detection of *Escherichia coli* O157 in ground beef by the VIDAS /E.coli/ O157 assay. POSTER présenté lors du congrès : 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – producing *Escherichia coli* infections (VTEC 2006 Melbourne).

Références bibliographiques

- Afssa (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
- Andral, B., Fach, P., Aspan, A., Pérelle, S., Lazizzera, C. et Pichoire, M. (2004) Recherche d'*Escherichia coli* productrices de Shiga toxines. Bilan d'une étude réalisée en abattoir portant sur *E. coli* O157 : H7. *Bulletin des GTV* **25**: 485–491.
- Bell B.P., Goldoft, M, Griffin, P.M, Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G., *et al.* (1994) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* **272**:1349-53.
- Bellara, S.R., Fryer, P.J., McFarlane, C.M., Thomas, C.R., Hocking, P.M., Mackey, B.M., (1999). Visualization and modelling of the thermal inactivation of bacteria in a model food. *Appl Environ Microbiol.* 65, 3095-9.
- Belongia, E.A., MacDonald, K.L., Parham, G.L., White, K.E., Korlath, J.A., Lobato, M.N., Strand, S.M., Casale, K.A., Osterholm M.T. (1991) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *J Infect Dis* **164**:338-43.
- Bender, J.B., Smith ,K.E ., McNees, A.A. , Rabatsky-Ehr, T.R., Segler, S.D., Hawkins, M.A., Spina, N.L. , Keene ,W.E., Kennedy, M.H., Van Gilder, T.J., Hedberg, C.W. (2004) Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Factors affecting surveillance data on *Escherichia coli* O157 infections collected from FoodNet sites, 1996-1999. *Clin Infect Dis.* **38** 3:S157-64.
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y ., Murray, W.J., Tobe, T., Fernandez, R., Schoolnik GK.(1998) Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, **280**:2114-8.
- Bender, J.B., Smith ,K.E ., McNees, A.A. , Rabatsky-Ehr, T.R., Segler, S.D., Hawkins, M.A., Spina, N.L. , Keene ,W.E., Kennedy, M.H., Van Gilder, T.J., Hedberg, C.W. (2004) Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Factors affecting surveillance data on *Escherichia coli* O157 infections collected from FoodNet sites, 1996-1999. *Clin Infect Dis.* **38** 3:S157-64.
- Bigelow W.D., Esty, J.R., (1920). The thermal death point in relation to typical hemophilic organisms. *Journal of infectious diseases*, 27, 602-617.
- Bolton *et al.* (1996). F.J. Bolton, L. Crozier and J.K. Williamson, Isolation of *Escherichia coli* from raw meat products. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, pp. 317–321
- Brooks, S.P., Gelman, A. (1998) Alternative methods for monitoring convergence of iterative simulations. *J Comput Graphl Stat* **7**: 434-455.
- Buchanan, R.L., Smith, J.L., Long, W. (2000) Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *Int J Food Microbiol* **58**:159-72.
- Cagney *et al.*, 2004 C. Cagney, H. Crowley, G. Duffy, J.J. Sheridan, S. O'Brien and E. Carney *et al.*, Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland (2004), *Food Microbiology* **21** (2), pp. 203–212.

Canadian paediatric surveillance program (CPSP). Hemolytic uremic syndrome (April 2000 to March 2002). Final report. Health Canada, Canadian Paediatric Society.

Canivet, N., (2005). Application de la démarche AQR aux paramètres microbiologiques de l'eau de distribution publique. Rapport Afssa-ENGREF-ISAA, Paris, pp. 157 p.

Carlin, B.P., Louis, T.A. (2000) Bayes and empirical Bayes methods for data analysis. Texts in Statistical Science, 2nd edn. Capman & Hall/CRC, Boca Raton.

Cartier, P. (1993) Importance, origine et mode d'appréciation de la contamination salmonellique des carcasses de gros bovins. *Viandes et Produits carnés* **14** (2): 35-38.

Cartier, P. (1994) Hygiène en amont de l'abattage : évolution de la charge bactérienne et de l'état de propreté des cuirs des gros bovins de la ferme au poste de dépouille. Intérêt de la prise en compte de l'état de propreté des animaux. *Rapport d'étude INTERBEV*.

Cassin, M.H., Lammerding, A.M., Todd, E.C., Ross, W., McColl, R.S. (1998). Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int J Food Microbiol* **41**, 21-44.

Centers for Disease Control and Prevention. (1993) Update : Multistate outbreak for *Escherichia coli* O157:H7 Infections from hamburgers -- Western United States, 1992-1993.; *MMWR* **42** :258-63.

Centers for Disease Control and Prevention. (1997) *Escherichia coli* O157:H7 Infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers -- Colorado, 1997. *Morb Mortal Wkly Rep* **46** : 777-8.

Centers for Disease Control and Prevention. (2002) Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef—United-States, June-July 2002. *MMWR* **51**: 637-9.

Chen, L., Geys, H., Cawthraw, S., Havelaar, A., Teunis, P. (2006) Dose response for infectivity of several strains of *Campylobacter jejuni* in chickens. *Risk Anal* **26**:1613-21.

Chinen *et al.*, 2001 I. Chinen, J.D. Tanaro, E. Miliwebsky, L.H. Lound, G. Chillemi and S. Ledri *et al.*, Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina, *Journal of Food Protection* **64** (2001) (9), pp. 1346–1351.

Cieslak, P.R., Noble, S.J., Maxson, D.J., Empey, L.C., Ravenholt, O., Legarza, G., Tuttle, J., Doyle, M.P., Barrett, T.J., Wells, J.G., McNamara, A.M., Griffin, P.M. (1997) Hamburger-associated *Escherichia coli* O157:H7 infection in Las Vegas: a hidden epidemic. *Am J Public Health* **87**:176-80.

Clopper, C. J. and Pearson, E. S., 1934. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika*, **26**, 404–413.

Coia, J.E., Currow, J., Reilly, W.J., Synge, B.F., Sharp, J.C.M. (1995) Ten years' experience of *E. coli* O157 infection in Scotland (1984-1993). *Weekly report* **29**;01:3-4.

Cowden, J.M., Ahmed, S., Donaghy, M., Riley A. (2001) Epidemiological investigation of the Central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol Infect* **126**:335-41.

CREDOC-Afssa-DGAL, 2000. Enquête nationale sur les consommations alimentaires, Editions Tec & Doc.

Crockett, C. S., Haas, C. N., Fazil, A., Rose, J. B., Gerba, C. P. (1996). Prevalence of shigellosis in the U.S.: consistency with dose-response information. *Int J Food Microbiol* **30**: 87-99.

Derval I. (2001) The epidemiology of verocytotoxigenic *E. coli* O157:H7 in Ireland. In : Duffy G, Garvey P, Coia J, Wasteson Y and McDowell DA, editors. Verocytotoxigenic *E. coli*. Food and Nutrition Press, Inc.; p 67.

Desenclos, J.C. (1996). Epidémiologie des risques toxiques et infectieux liés à la consommation de coquillages. *Rev. Epidemiol. Sante. Publique* **44**, 437-454.

Desenclos, J.-C., V. Vaillant, *et al.* (2002). "Les questions de santé publique et de recherche qui se posent dans le domaine du risque alimentaire infectieux justifient-elles de nouveaux recueil de données ?" *Rev. Epidemiol. Sante Publique* **50**: 67-79.

Doorduyn, Y., de Jager, CM., van der Zwaluw, WK., Friesema, I., Heuvelink, A., de Boer, E., Wannet, W.J., van Duynhoven, Y.T. (2006). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September-October 2005. *Euro Surveill.* **20** ; 11(7).

D'Sa, E.M., Harrison, M.A., Williams, S.E., Broccoli, M.H., 2000. Effectiveness of two cooking systems in destroying *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in ground beef patties. *J. Food. Prot.* **63**, 894-9.

DuPont, H.L., Hornick, R.B., Dawkins, A.T., Snyder, M.J., and Formal, S.B. (1969) The response of man to virulent *Shigella flexneri* 2a. *J Infect Dis* **119**: 296-299.

DuPont, H.L., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Libonati, J.P., Formal, S.B., and Gangarosa, E.J. (1972) Immunity in shigellosis. II. Protection induced by oral live vaccine or primary infection. *J Infect Dis* **125**: 12-16.

Dykes, G.A. (2006) Laboratory-based simulation of freezing profiles of beef trim for *Escherichia coli* O157 survival determinations. *J Microbiol Methods* **64**: 266-274.

Eisenberg, J.N., Soller, J.A., Scott, J., Eisenberg, D.M., Colford, J.M., Jr. (2004) A dynamic model to assess microbial health risks associated with beneficial uses of biosolids. *Risk Anal* **24**, 221-236.

Elder *et al.*, 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in feces, hide and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci* **97**(7):2999-3003.

Elliott, E.J., Robins-Browne, R.M., O'Loughlin, E.V., Bennett-Wood, V., Bourke, J., Henning, P., Hogg, G.G., Knight, J., Powell, H., Redmond, D. (2001) Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child.* **85**:125-31.

Espié, E., Grimont, F., Mariani-Kurdjian P., Filliol, I., Vaillant, V., et le réseau des néphrologues pédiatres (2007). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2006. Institut de veille sanitaire. Available at <http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/default.htm>.

Espié, E., Grimont, F., Mariani-Kurdjian, P., Vaillant, V. et le réseau des néphrologues pédiatres (2006) Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2005. Institut de veille sanitaire. Available at <http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/default.htm>.

Espié, E., Nhu Nguyen, T.M, Mariani-Kurdjian, P., Grimont, F., Novo, R., Cloarec, S., Vaillant, V., De Valk, H. (2006). Évaluation de la surveillance du syndrome hémolytique et urémique typique ou post-diarrhéique en France 1996-2003. Institut de veille sanitaire. Août 2006, 29p. Available at http://www.invs.sante.fr/publications/2006/shu_1996_2003/shu_1996_2003.pdf.

Espié, E., Vaillant, V., Durr, U., Barataud, D., Bouvet, P., Grimont, F., et le réseau des néphrologues pédiatres (2003) Facteurs de risque des syndromes hémolytiques et urémiques sporadiques chez des enfants de moins de 15 ans en France : étude cas-témoins 2000-2001. *BEH* **20** : 91-92.

Fantelli and Stephan, 2001 K. Fantelli and R. Stephan, Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland, *International Journal of Food Microbiology* **70** (2001) (1–2), pp. 63–69.

FAO/OMS 1995. Application of risk analysis to food standards issues. FAO/OMS

Fegan, N., Higgs, G., Vanderlinde, P., and Desmarchelier, P. (2005) An Investigation of *Escherichia coli* O157 Contamination of Cattle during Slaughter at an Abattoir. *Journal of Food Protection* **68**(3): 451-457.

Fegan, N., Vanderlinde, P., Higgs, G. and Desmarchelier, P. (2004) The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production system at slaughter. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 362-370.

FSIS (2001) Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/00-023NReport.pdf>.

Gerba, C., Rose, J.B. & Haas, C.N. 1996. Sensitive populations : who is at greatest risk? *Int Journal of Food Microbiology* (30), 113-123.

Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N. & Crabtree, K.D. 1996b. Waterborne rotavirus : a risk assessment. *Wat. Res.* 30 (12), 2929-2940.

Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H.M., Zimmerhackl, L.B. (2002) Clinical course and the role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic –uremic syndrome in pediatric patients 1997-2000 in Germany and Austria : a prospective study. *J Infect Dis* **186** :493-500.

Giovannini, A., Prencipe, V., Conte, A., Marino, L., Petrini, A. & Pomilio, F. 2004. Quantitative risk assesment of salmonella spp infection for the consumer of pork products in an italian region. *Food control* 15, 139-144.

Gofti-Laroche, L., Potelon J.L., Da Silva, E. & Zmirou, D. 2001. Description de la consommation d'eau de boisson dans certaines communes françaises (étude EMIRA). *Rev. Epidemiol. Sante. Publique* 49, 411-422.

Griffin PM, Mead PS, Van Gilder T, Hunter SB, Strockbine NA. Epidemiology of shiga toxin-producing *E. coli* infections in the United States : update, successes and challenges. In : Duffy G, Garvey P, Coia J, Wasteson Y and McDowell DA. Editors of Conference Proceedings on Epidemiology of Verocytotoxigenic *E. coli* organised by EU Concerted Action (CT98-3935) in Malahide, Dublin, Ireland 8-10th February 2001.

Griffin, P.M., Mead, P.S., Van Gilder, T., Hunter, S.B., Strockbine, N.A. (2001) Epidemiology of *Shiga* toxin-producing *E. coli* infections in the United States: update, successes and challenges. In: Duffy G, Garvey P, Coia J, Wasteson Y and McDowell DA, editors. Verocytotoxigenic *E. coli*. Food and Nutrition Press, Inc.; p56-57

Griffin, P.M., Ostroff, S.M., Tauxe, R.V., Greene, K.D., Wells, J.G., Lewis, J.H., Blake, P.A. (1988) Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann Intern Med.* **109**:705-12.

Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* **13**: 60-98.

Haas C.N., Thayyar-Madabusi A., Rose, J. B., Gerba C.P. (2000) Development of a dose-response relationship for *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **56**, 153-9.

Haas, C. N. (1983). Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *Am J Epidemiol* **118**, 573-82.

Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P.(1999). Quantitative microbial risk assessment. John Wiley and sons, USA, New York, 449 pp.

Havelaar, A.H., Garssen J, Takumi K, Koedam MA, Dufrenne JB, van Leusden FM, de La Fonteyne L, Bousema JT, Vos JG (2001).A rat model for dose-response relationships of *Salmonella* *Enteritidis* infection.. *J Appl Microbiol*, **91**:442-52.

Havelaar, A.H., Van Duynhoven, Y.T., Nauta, M.J., Bouwknecht, M., Heuvelink A.E., De Wit G.A., Nieuwenhuizen, M.G, van de Kar NC.(2004) Disease burden in The Netherlands due to infections with *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* O157 *Epidemiol Infect.* **132**:467-84.

Heuvelink A.E. , J.T.M. Zwatkruis-Nahuis, R.R. Beumer and E. De Boer, Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands, *Journal of Food Protection* **62** (1999) (10), pp. 1115–1122.

Holcomb, D.L., Smith, M.A., Ware, G.O., Hung, Y.C., Brackett, R.E., Doyle, M.P. (1999). Comparison of six dose-response models for use with food-borne pathogens. *Risk Anal* **19**: 1091-100.

Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* **5**: 299-314.

INCA : enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires "Enquête INCA individuelle et nationale sur les consommations alimentaires. JL Volatier-éditions Tec et Doc, 2000"

Infectious Agents Surveillance Report (IARS). (1996) Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection, 1996, Japan. Infectious diseases surveillance center 1996 ; 17 (8). Available at <http://idsc.nih.gov/iasr/17/198/tpc198.html>.

Infectious Agents Surveillance Report (IARS). (1997) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (enterohemorrhagic *E. coli*) infections, Japan, 1996-June 1997. Infectious diseases surveillance center 1997 ; 18 (7) Available at <http://idsc.nih.gov/iasr/18/209/tpc209.html>.

InVS 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. 192 p.

Jay, M.T., Garrett, V., Mohle-Boetani, J.C., Barros, M., Farrar, J.A., Rios, R., Abbott, S., Sowadsky, R., Komatsu, K., Mandrell, R., Sobel, J., Werner, S.B. (2004) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of beef tacos at a fast-food restaurant chain. *Clin Infect Dis* **39**:1-7.

Juneja, V.K., Snyder, O.P., Williams, A.C., Marmer, B.S., 1997. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburger. *J. Food Protect.* 60, 1163-1166.

Keene, W. E., Sazie E., Kok J., Rice D.H., Hancock D.D., Balan V.K., Zhao T., Doyle M.P. (1997) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *JAMA* **277**, 1229-31.

King, L.A., Mailles, A., Mariani-Kurkdjian, P., Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Grimont, F., Pihier, N., DeValck, H., Bingen, E., Espie, E., Vaillant, V. (2007) Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers – South-West France, 2005. *MMWR* In press.

Koohmaraie M., Arthur T.M., Bosilevac J.M., Guerini M., Shackelford S.D. and Wheeler T.L. (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science* **71**. 79–91.

Leclerc, V. (2000). Le dénombrement des Salmonelles dans les plats témoins congelés ou réfrigérés. Apport de données quantifiées dans le cadre de l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives. Rapport DGAl. p 1-92.

Leclerc, V. (2002). Enumeration of low doses of injured *Salmonella* and exposure assessment. International Symposium Salmonella and Salmonellosis, 73-77.

Levine, M.M, DuPont, H.L., Formal, S.B., Hornick, R.B, Takeuchi, A., Gangarosa, E.J., Snyder, M.J., Libonati, J.P. (1973) Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1 (*Shiga* dysentery). *J Infect Dis* **127**:261-70.

Levine, M.M., E.J. Bergquist, D.R. Nalin, D.H. Waterman, R.B. Hornick, C.R. Young, S. Sotman. (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**:1119.

Lindgren, S. W., Samuel, J. E., Schmitt, C. K., O'Brien, A. D. (1994). The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect Immun* **62**, 623-31.

Lopez EL, Diaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE, Ashkenazi S, Rubeglio E, Woloj M, Vasquez M, *et al.* (1989) Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis* **160**:469-75.

Lucbert, J., Cartier, P., Gueguen, L. et Chatelin, Y.M. (2005). Etat des lieux de la propreté des bovins à l'entrée de l'abattoir. *Rapport d'étude INTERBEV-OFIVAL*, 27 pages .

MacDonald KL, O'Leary MJ, Cohen ML, *et al.* (1988) *Escherichia coli* O157:H7, an emerging gastrointestinal pathogen: results of a one-year, prospective, population-based study. *JAMA* **259**:3567-70.

MacDonald, I.A., Gould, I.M., Curnow J. (1996) Epidemiology of infection due to *Escherichia coli* O157 : a 3-year prospective study. *Epidemiol Infect* **116** : 279-84.

Mac Donnell, R.J., Rampling, A., Crook, S., Cockcroft, P.M., Wilshaw, G.A., Cheasty, T., Stuart J. (1997) An outbreak of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection associated with takeaway sandwiches. *Communicable disease report*; 7 (13) R201-205.

Manning S.D., Madera R.T., Schneider W., Dietrich S.E., Khalife W., Brown W., Whittam T.S., Somsel P., Rudrik J.T. (2007). Surveillance for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Michigan, 2001–2005. *Emerg Infect Dis* **13** : 318-321.

McGee, P., Scott, L., Sheridan J.J., Earley, B. and Leonard, N. (2004) Horizontal transmission of *Escherichia coli* O157:H7 during cattle housing. *Journal of Food Protection* **67 (12)**: 2651-2656.

Mead PS, Griffin PM. 1998 *Escherichia coli* O157. *Lancet* **352**: 1207-1212.

Michel, P., Wilson, J. B., Martin, S. W., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Gyles, C. L. (2000). Estimation of the under-reporting rate for the surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 cases in Ontario, Canada. *Epidemiol Infect* **125**: 35-45.

Miconnet, N., Cornu, M., Beaufort, A., Rosso, L., Denis, J.B., 2005. Uncertainty distribution associated with estimating a proportion in microbial risk assessment. *Risk Analysis* **25**, 37-46.

Minihan, D., O'Mahony, M., Whyte, P. and Collins, J.D. (2003) An investigation of the effect of transport and lairage on the faecal shedding prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle. *J. Vet. Med.* **B 50**: 378-382.

Murphy, R.Y., Martin, E.M., Duncan, L.K., Beard, B.L., Marcy, J.A., 2004. Thermal process validation for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in ground turkey and beef products. *J. Food Prot.* **67**, 1394-402.

National Disease Surveillance Centre. Epidemiology of verotoxigenic *E. coli* O157 in Ireland, 2002. Epi-Insight. Disease surveillance report of NDSC, Ireland. 2003 Sept; 4(6): 2-3.

Nauta, M.J. (2000). Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of food Microbiology* **57**, 9-18.

Nauta, M. J., Evers, E. G., Takumi, K. & Havelaar, A. H. (2001). Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands. RIVM report n°257851003. p 1-169.

O'Brien, S.B., Duffy, G., Carney, E., Sheridan, J.J., McDowell, D.A. and Blair, I.S. (2005) Prevalence and Numbers of *Escherichia coli* O157 on Bovine Hides at a Beef Slaughter Plant. *Journal of Food Protection* **68** (4): 660-665.

OMS 2003. *Guidelines for drinking water quality*.

OMS-OCDE 2003. *Assessing microbial safety of drinking water*. London, IWA. 295 p.

Ou, D., Mittal, G.S., (2006). Double-sided pan-frying of unfrozen/frozen hamburgers for microbial safety using modelling and simulation. *Food Res. Int.* 39, 133-144.

Orr, P., Lorencz, B., Brown, R., Kielly, R., Tan, B., Holton, D., Clugstone, H., Lugtig, L., Pim, C., MacDonald, S., Hammond, G., Moffatt, M., Spika, J., Manuel, D., Winther, W., Milley, D., Lior, H., Sinuff, N. (1994) An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand J Infect Dis* **26** : 675-84.

Ostroff, S.M., Kobayashi, J.M., Lewis, J.H. (1989) Infections with *Escherichia coli* O157 : H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. *JAMA* **262**: 355-9.

Ou, D., Mittal, G.S., 2006. Double-sided pan-frying of unfrozen/frozen hamburgers for microbial safety using modelling and simulation. *Food Res. Int.* 39, 133-144.

Pai, C. H., Kelly, J. K. & Meyers, G. L. (1986). Experimental infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **51**: 16-23.

Pai, C.H., Ahmed, N., Lior, H., Johnson, W.M., Sims, H.V., Woods, D.E (1988). Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. *J Infect Dis* **157**:1054-7.

Pan, Z., Singh, R.P., Rumsey, T.R. 2000. Predictive modeling of contact-heating process for cooking a hamburger patty. *Journal of Food Engineering*. 46, 9-19.

Pavia, A.T., Nichols, C.R., Green, D.P., Tauxe, R.V., Mottice, S., Greene, K.D., Wells, J.G., Siegler, R.L., Brewer, E.D., Hannon, D., et al. (1990) Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O156:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr* 116 : 544-51.

Petterson, S.R. & Ashbolt, N.J. (2001). Viral risks associated with wastewater reuse : modelling virus persistence on wastewater irrigated salad crops. In *Water Science and Technology*. Vol. 43. OMS (ed). London, IWA Publishing, pp. 23-26.

Pouillot, R., Albert, I., Cornu, M. & Denis, J.B. 2003. Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*. *International Journal of food Microbiology* 81, 87-104.

Powell, M., Ebel, W. Schlosser, M. Walderhaug, and J. Kause. (2000) .Dose-response envelope for *Escherichia coli* O157:H7. *Quant Microbiol* **2**:141-163.

Pruss, A., Havelaar, A.H.(2001) The global burden of disease study and applications in water, sanitation and hygiene. In: Fewtrell, L., Bartram, J. (Eds.), *Water Quality : guidelines, standards and health*. IWA, London.

- Rai, S.N., Krewski, D. & Bartlett, S. 1996. A general framework for the analysis of uncertainty and variability in risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 2 (4), 972-989.
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., Swerdlow, D.L. (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11:603-9.
- Raynaud, S., et Heuchel, V. (2005) Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins français. *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants* 12: 379-392.
- Reinders, R.D., De Jonge, R., Evers, E.G., 2003. A statistical method to determine whether microorganisms are randomly distributed in a food matrix, applied to coliforms and *Escherichia coli* O157 in minced beef.
- Relevé des Maladies Transmissibles au Canada. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak at a summer hockey camp, Sudbury 2004. Canada Communicable Disease Report 2004; 30 (22) : 189-194.
- Remis R.S., MacDonald K.L., Riley L.W., Puhf N.D., Wells J.G., Davis B.R., Blake P.A., Cohen M.L. (1984). Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Ann Intern Med* 101:624-6.
- Rhee, M.S., Lee, S.Y., Hillers, V.N., McCurdy, S.M., Kang, D.H., 2003. Evaluation of consumer-style cooking methods for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Food Prot.* 66, 1030-4.
- Rivas M., Miliwebsky E., Chinen I., Roldan C.D., Balbi L., Garcia B., Fiorilli G., Sosa-Estani S., Kincaid J., Rangel J., Griffin P.M., The Case-Control Study Group (2006). Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* 3:88-96.
- Robinson, S.E., Brown, P.E., Wright, E.J., Bennett M., Hart, C.A. and French, N.P. (2005) Heterogeneous distributions of *Escherichia coli* O157 within naturally infected bovine faecal pats. *FEMS Microbiology Letters* 244(2): 291-296.
- Robinson, S.E., Wright, E.J., Hart, C.A., Bennett M. and French, N.P. (2004) Intermittent and persistent shedding of *Escherichia coli* O157 in cohorts of naturally infected calves. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1045-1053.
- Rocelle, M., Clavero, M.R., Beuchat, L.R., Doyle, M.P. (1998). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ground beef and bovine feces, and suitability of media for enumeration. *J. Food Prot.* 61, 285-9.
- Rodrigue, D.C., Mast, E.E., Greene, K.D., Davis, J.P., Hutchinson, M.A., Wells, J.G., Barret, T.J., Griffin, P.M. (1995) A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J Infect Dis* 272: 1349-53.
- Rogerie *et al.* (2001). Characterisation of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. *Int. J. Food Microbiology.* 63, 217-223
- Rowe, P.C., Orrbine, E., Lior, H., Wells, G.A., McLaine, P.N. (1993) Diarrhoea in close contacts as a risk for childhood haemolytic uraemic syndrome. The CPKDRC co-investigators. *Epidemiol Infect* 110 : 9-16.

Ryan, C.A., Tauxe, R.V., Hisek, G.W., Wells, J.G., Stoesz, P.A., McFadden, H.W Jr., Smith, P.W., Wright, G.F., Blake, P.A. (1986). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J Infect Dis* **154**:631-8.

Samadpou M. r, M. Kubler, F.C. Buck, G.A. Depavia, E. Mazengia and J. Stewart *et al.*, (2002) Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle feces from King Country, Washington, *Journal of Food Protection* **65** (8), pp. 1322–1325.

Sanaa, M., Cerf O. (2002) La démarche d'analyse quantitative des risques de maladies infectieuses transmises par les aliments. *Epidémiologie et santé animale* **41**: 157-168.

SECODIP : société d'étude de la consommation et des investisseurs publicitaires

Scheutz, F., Olesen, B., Engberg, J., Munk Petersen, A., Mølbak, K., Schiellerup, P., Gerner-Smidt, P. (2001) Clinical features and epidemiology of infections by Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) from Danish patients 1997-2000, and characterisation of VTEC isolates by serotypes and virulence factors. In : Duffy G, Garvey P, Coia J, Wasteson Y and McDowell DA. Editors of Conference Proceedings on Epidemiology of Verototoxigenic *E. coli* organised by EU Concerted Action (CT98-3935) in Malahide, Dublin, Ireland 8-10th February 2001.

Shinagawa, K. (1997). Correspondance and problem for Enterohemorrhagic *E. coli* O157 outbreak in Morioka city, Iwate. *Koshu Eisei Kenkyu* **46**: 104-112.

Slutsker, L., Ries, A.A., Greene, K.D., Wells, J.G., Hutwagner, L., Griffin, P.M. (1997) Clinical and epidemiological features of *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States. *Ann Intern Med* **136** : 505-13.

Strachan, N. J., Fenlon, D. R., Ogden, I. D (2001). Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* **203**:69-73.

Strachan, N.J.C., Macrae, M. and Ogden, I.D. (2005) Quantification of the *Escherichia coli* O157 reservoir in Grampian, Scotland. *Veterinary Record* 156(9): 282-283.

Strachan, N. J., Doyle, M.P., Kasuga, F., Rotariu, O., Ogden, I.D. (2005). Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *Int J Food Microbiol* **103**:35-47.

Tarr P.I. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 : clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis*; 20:1-10.

Tarr P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L. (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365** : 1073-1086.

Tarr P.I., N.T. Tran and R.A. Wilson (1999), *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *J. Food Prot.* **62**, pp. 133–139.

Teunis, P. F., Havelaar, A. H. (2000). The Bêta Poisson dose-response model is not a single-hit model. *Risk Anal* **20**: 513-20.

Teunis, P. F., Nagelkerke, N. J. & Haas, C. N. (1999). Dose response models for infectious gastroenteritis. *Risk Anal* 19, 1251-60.

- Teunis, P., Takumi, K., Shinagawa, K. (2004). Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data. *Risk Anal* **24**: 401-7.
- Teunis, P.F.M., Nagelkerke, N.J.D. and Haas, C. (1999). Dose response models for infectious gastroenteritis. *Risk Anal.* **19**: 1251-1260.
- Thomas, A., Chart, H., Cheasty, T., Smith, H.R., Frost, J.A., Rowe, B. (1993) Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O 157, associated with human infections in the United Kingdom: 1989-91. *Epidemiol Infect* **110**:591-600.
- Thomas, A., Cheasty, T., Frost, J.A., Chart, H., Smith, H.R., Rowe B. (1996) Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales: 1992-4. *Epidemiol Infect* **117**:1-10.
- Thomas, A., O Hara, B., Ligges, U., and Sturtz, S. (2006) Making BUGS Open. *R News* **6**: 12-17.
- Tilden, J. Jr., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., Morris, J.G. Jr. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health.* **86**:1142-5.
- Toft, N., Innocent, G.T., Mellor, D.J., Reid, S.W.J., 2006. The Gamma-Poisson model as a statistical method to determine if micro-organisms are randomly distributed in food matrix. *Food Microbiol.* **23**, 90-94.
- Tozzi, A.E., Caprioli, A., Minelli, F., Morabito, S., Marziano, M.L., Goriotti, S., Pichiorri, T., Gianviti, A., De Petris, L., Rizzoni, G. (2003) Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg Infect Dis* **9**:106-108.
- Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M.P., Wells, J. G., Zhao, T., Tauxe, R. V., Griffin, P. M. (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. *Epidemiol Infect* **122**: 185-92.
- Van Duynhoven, Y.T., De Jager, C.M., Heuvelink, A.E., Van Der Zwaluw, W.K., Maas, H.M., Van Pelt, W., Wannet, W.J. (2002) Enhanced laboratory-based surveillance of *Shiga*-toxin-producing *Escherichia coli* O157 in The Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**:513-22.
- Van Wijnen, J. H., Clausing, P., Brunekreef, B. (1990). Estimated soil ingestion by children. *Environ Res* **51**: 147-62.
- Vernozy-Rozand C., S. Ray-Gueniot, C. Ragot, C. Bavai, C. Mazuy and M.P. Montet *et al.* (2002), Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef, *Letters in Applied Microbiology* **35** (1), pp. 7–11.
- Vose, D. 2000. *Risk analysis : a quantitative guide*. New York, John Wiley and sons. 418 p.
- Wagner, M., Allerberger, F., Manafi, M., Lindner, G., Friedrich, A.W., Sonntag, A.K., Foissy, H. (2004) Characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from humans in Austria: phenotypes, toxin gene types and epidemiology. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* **51**:288-92.

Warner, M., Kuo, K., Williams, L., Ruden, R.(1996). Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *MMWR* **45**: 437-439.

Waters, J.R., Sharp, J.C., Dev, V.J. (1994). Infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada, and in Scotland: a five-year review, 1987-1991. *Clin Infect Dis.* **19**:834-43.

Willshaw, G.A., Smith, H.R., Cheasty, T., Wall, P.G., Rowe, B. (1997). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 outbreaks in England and Wales, 1995: phenotypic methods and genotypic subtyping. *Emerg Infect Dis.* **3**:561-5.

Zorrilla, S.E., Banga, J.R., Singh, R.P. (2003). Dynamic optimization of double-sided cooking of meat patties. *Journal of Food Engineering.* **58**, 173-182.

Zorrilla, S.E., Singh, R.P. (2003). Heat transfer in double-sided cooking of meat patties considering two-dimensional geometry and radial shrinkage. *Journal of Food Engineering.* **57**, 57-65.

Zhao, T., Doyle, M.P., Kemp, M.C., Howell, R.S., Zhao, P., 2004. Influence of freezing and freezing plus acidic calcium sulfate and lactic acid addition on thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Food Prot.* **67**, 1760-4.