



Maisons-Alfort, le 11 janvier 2011

Le directeur général

AVIS

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

relatif à la révision de la définition des *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) majeurs typiques, à l'appréciation quantitative des risques liés à ces bactéries à différentes étapes de la chaîne alimentaire, selon les différents modes de consommation des steaks hachés, et à la prise en compte du danger lié aux *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) dans les aliments.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été saisie le lundi 11 janvier 2010 par la Direction Générale de la Santé (DGS) et la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) d'une demande d'avis relatif à la révision de la définition des STEC¹ pathogènes, à l'appréciation quantitative des risques liés à ces bactéries à différentes étapes de la chaîne alimentaire, selon les différents modes de consommation des steaks hachés, et à la prise en compte du danger lié aux *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) dans les aliments.

2. CONTEXTE

Dans le cadre de cette saisine (2010-sa-0031), le Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche et le Ministère de la santé ont souhaité recueillir auprès de l'Afssa les éléments de réponse disponibles et des recommandations en lien avec les questions suivantes :

- (Q1) Les données scientifiques, acquises en France ou dans d'autres pays depuis 2008 concernant les STEC pathogènes, sont-elles de nature à modifier les conclusions de l'avis du 15 juillet 2008 (Afssa 2008a) ?
- (Q2) Quelles sont les concentrations en STEC pathogènes dans la viande hachée de bovins au-dessus desquelles peuvent être observés :
 - des cas groupés de syndrome hémolytique et urémique SHU ?
 - un cas de SHU associé à des cas de diarrhée dans l'entourage ?
 - des cas sporadiques de SHU ?
- (Q3) Les connaissances actuelles remettent-elles en cause les conclusions du considérant 14 du Règlement (CE) N°2073/2005 modifié et la note de bas de page N°8 du chapitre 2 de l'annexe 1 du même règlement ? L'Afssa peut-elle préciser si le critère indicateur de contamination fécale *E. coli* du Règlement (CE) N°2073/2005 reste le seul critère pertinent pour la maîtrise du risque STEC pathogène dans la filière viande hachée ? Est ce qu'un autre critère de contamination fécale serait plus pertinent voire complémentaire dans le cadre des autocontrôles permettant de vérifier l'efficacité du plan de maîtrise sanitaire, en ce qui concerne le danger STEC pathogène ?

Quels sont les indicateurs d'hygiène pertinents pour suivre la contamination fécale dans la filière « viande hachée », au regard des risques pour la santé publique mentionnés dans le considérant 14 du Règlement (CE) N°2073/2005 modifié ?

¹ *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC)

- (Q4) Est-il opportun de mettre en place des protocoles d'études pour acquérir des données sur :
 - les facteurs influençant le niveau de contamination par les STEC pathogènes des fèces, des pelages et des carcasses, depuis l'élevage jusqu'à la transformation ;
 - les relations dose-réponse, en lien avec l'InVS ;
 - les modes de préparation, de conservation et de cuisson ;afin de compléter l'appréciation quantitative de risque présentée dans le rapport « *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* » de l'Afssa (Afssa, 2007a) ?
- (Q5) Quels sont la définition et le pouvoir pathogène des EPEC ? Est-il opportun de maintenir les mesures de gestion actuelles pour les fromages au lait cru ?

Un premier avis de l'Afssa a été rendu le 27 mai 2010 pour répondre à la première question relative à la révision de la définition des STEC pathogènes. Ce second avis présente les réponses aux quatre dernières questions transmises à l'Afssa dans le cadre de cette saisine.

En amont de la réflexion menée par le groupe de travail, une audition a été organisée le 23 mars 2010 pour clarifier l'attente de l'administration sur ces quatre dernières questions. La DGAI a alors indiqué son souhait d'adapter au mieux les mesures de gestion du risque lié à la consommation de steaks hachés. Pour cela, l'administration souhaite définir les concentrations de STEC pathogènes, dans les mêlées de viande hachée à l'origine des lots de steaks hachés contaminés, à partir desquelles seraient observées les différentes formes cliniques (syndrome hémolytique et urémique, diarrhée aqueuse, diarrhée sanglante) et épidémiologiques (cas isolé, cas groupés) de la maladie humaine. Les précédents travaux de l'Afssa reposent sur une hypothèse d'homogénéité de la contamination des lots qui peut être aujourd'hui rediscutée. La question 2 a donc été reformulée : il s'agit de fournir aux gestionnaires du risque des éléments leur permettant de définir les plans d'échantillonnage optimaux pour rejeter les lots de steaks hachés contaminés, en fonction du caractère homogène ou hétérogène de la contamination des mêlées de viande hachée.

La DGS a souligné sa volonté de voir l'Agence prendre en compte pour l'évaluation des risques liés aux STEC pathogènes, non seulement les cas groupés de syndrome hémolytique et urémique (SHU), mais également les cas de SHU associés à des cas de diarrhée dans l'entourage. Cette demande, qui s'inscrit dans le cadre de l'application de la circulaire interministérielle DGS/EA3/DUS/DGAL/MUS/DGCCRF/C2/2009/248 du 3 août 2009, souligne l'importance de bien définir l'objectif recherché. Ainsi, il est apparu important de rappeler certaines définitions et de détailler les informations utiles à l'amélioration de la relation dose-réponse.

Un plan de surveillance a été mis en place par la DGAI en 2009 concernant la présence de STEC pathogènes dans la viande hachée réfrigérée et dans les fromages au lait cru au stade de la production. Ce plan a mis en évidence dans ces produits la présence de STEC potentiellement hautement pathogènes mais également d'AEEC (Afssa 2010), parfois abusivement nommées « EPEC ». En réponse à la question 5, il s'agit donc de rappeler la définition des bactéries considérées (EPEC et AEEC) et de dresser le bilan des connaissances scientifiques actuelles pour permettre au gestionnaire de prendre les mesures adaptées suite à l'isolement de ces souches.

Pour faciliter la lecture du document, une articulation des éléments de réponse, différente de celle des questions posées, a été choisie : (i) définitions ; (ii) critères microbiologiques pour la maîtrise du danger STEC pathogène ; (iii) bilan des connaissances disponibles en France et des données à collecter pour faciliter une AQR dans la filière « viande hachée » ; (iv) caractéristiques d'un lot de steaks hachés, issu d'une mêlée contaminée par des STEC pathogènes et pouvant conduire aux différentes formes épidémiologiques du SHU ; (v) identification du danger EPEC et de celui que pourraient représenter les souches AEEC isolées dans les aliments.

3. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective a été réalisée par le groupe de travail « EHEC EPEC 2010 » dont les conclusions ont été adoptées par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Microbiologie » réuni les 16 novembre et 14 décembre 2010.

Une audition des représentants de la DGAL a été réalisée le 23 mars 2010 par le groupe de travail. Par ailleurs, un appui scientifique et technique a été apporté au groupe de travail « EHEC EPEC 2010 », par l'unité « Appréciation quantitative du risque en microbiologie et santé animale (AQR-MSA) ».

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Agence nationale chargée de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail est fondé sur l'avis du groupe de travail « EHEC EPEC 2010 », adopté par le Comité d'experts spécialisé « Microbiologie », dont les éléments sont présentés ci-dessous :

4.1. Définitions

Les infections causées par les EHEC constituent un problème majeur en santé publique en raison de l'extrême sévérité des manifestations cliniques qu'ils peuvent générer en particulier les colites hémorragiques mais surtout le syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez les jeunes enfants et chez les personnes âgées. Le SHU est la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant de moins de 3 ans. La létalité varie de 3 à 5 % et plus d'un tiers des malades conservent des séquelles rénales à long terme. Les principaux modes de transmission des infections à EHEC à l'homme sont, sans ordre d'importance, la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (notamment les bovins) (Afssa 2008a).

Un **cas isolé** (ou sporadique) de SHU ou d'infection à EHEC est défini comme un cas de SHU/infection à EHEC sans lien épidémiologique (regroupement dans le temps, dans l'espace, par activité ou exposition à risque commune) avec d'autres cas de SHU ou d'infection à EHEC.

Un épisode de **cas groupés** de SHU ou d'infections à EHEC liés à une source de contamination commune est suspecté devant :

- au moins deux cas de SHU dans un délai d'un mois dans une même famille, une même collectivité (crèche, école, maison de santé) ou toute autre situation commune aux patients (par exemple, participation à un même événement) ;
- un cas de SHU associé à des cas de diarrhée dans son entourage dans les 15 jours précédant le début du SHU ;
- un nombre de cas de SHU ou d'infections à EHEC anormalement élevé regroupés dans le temps et sur une zone géographique donnée.

On parle **d'épidémie** quand un épisode de cas groupés touche plusieurs foyers familiaux ou des collectivités (dans lesquels il peut n'y avoir qu'un seul cas) à une échelle géographique plus large.

La relation « dose-réponse » est la relation entre l'amplitude de l'exposition (ici à un agent biologique), c'est à dire la dose, et la probabilité d'observer des effets néfastes pour la santé qui lui sont associés, c'est à dire la réponse (NF V 01-002).

4.2. Concernant les critères microbiologiques pour la maîtrise du danger STEC pathogène

4.2.1. Pertinence d'un critère de sécurité concernant le danger STEC pathogène

Dans son considérant 14, le Règlement (CE) N°2073/2005 modifié² se réfère à un avis du Comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique (CSMVSP) qui conclut que la mise en place d'une norme microbiologique pour le sérotype O157 n'entraînerait pas de réduction sensible du risque d'infection grave à EHEC pour les consommateurs en raison de la présence sporadique et de la faible prévalence globale de la bactérie dans les denrées alimentaires concernées. Ces données de prévalence n'ayant pas significativement évolué depuis la parution de cet avis (EFSA 2007a; EFSA 2009a; EFSA 2010; Hussein 2007), les conclusions du considérant 14 ne sont actuellement pas à remettre en cause pour les filières considérées à risque.

Comme il est mentionné dans l'avis du CSMVSP, si cette prévalence devait augmenter, la mise en place d'un critère microbiologique deviendrait un moyen efficace de maîtrise du risque. Cependant, la mise en place d'un critère microbiologique serait à considérer pour tous les sérotypes présentant un danger potentiel pour les consommateurs et non uniquement pour le sérotype O157. Il est également important de mentionner l'absence à ce jour d'un outil analytique performant dont la mise en œuvre simple et accessible permettrait de rechercher l'ensemble des STEC potentiellement pathogènes dans les produits alimentaires, en particulier pour les sérotypes autres qu'O157:H7. Dans une situation d'augmentation de prévalence, la modélisation mathématique permettra d'apprécier quantitativement l'effet de la mise en place d'un critère microbiologique, mais également de définir plus précisément les plans d'échantillonnage à suivre, en fonction des niveaux de prévalence observés dans les produits.

Il est cependant important de rappeler que, quelle que soit la situation, « *il ne faut pas confondre la liste des dangers, à définir dans le cadre du PMS, et les critères présents dans le règlement. L'absence de critère réglementaire ne signifie pas absence de danger à prendre en compte* »³.

4.2.2. Critères d'hygiène des procédés pour le suivi de la contamination fécale

Le Règlement (CE) N°2073/2005 modifié définit un critère d'hygiène du procédé comme étant « *un critère indiquant l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production. Un tel critère n'est pas applicable aux produits mis sur le marché. Il fixe une valeur indicative de contamination dont le dépassement exige des mesures correctives destinées à maintenir l'hygiène du procédé conformément à la législation sur les denrées alimentaires* ».

Les critères d'hygiène des procédés peuvent être utilisés à différentes fins : (i) l'évaluation ponctuelle de la maîtrise d'un procédé de fabrication, (ii) la validation de l'efficacité des bonnes pratiques d'hygiène lors de leur mise en place, (iii) la surveillance de l'efficacité des bonnes pratiques d'hygiène afin de détecter d'éventuelles dérives et (iv) la vérification de l'efficacité de bonnes pratiques d'hygiène (Afssa 2008b).

La flore totale est un critère usuel d'hygiène des procédés dans les abattoirs (Ghafir, China *et al.* 2008). Cet indicateur, bien que directement corrélé aux dénombrements des *E. coli*, est davantage révélateur de l'hygiène générale des procédés qu'un indicateur spécifique de la contamination d'origine fécale.

Les *Enterobacteriaceae* sont considérées comme un indicateur de contamination d'origine fécale et de contamination par l'environnement. En effet, de nombreuses espèces de ce groupe peuvent persister dans l'environnement (Ghafir, China *et al.* 2008).

Le Tableau 1 de l'avis Afssa du 18 janvier 2007 précise que « *Par ordre de spécificité fécale croissante, on note : entérobactéries croissant à 30 °C, coliformes croissant à 30 °C, coliformes thermotolérants croissant à 44 °C, Escherichia coli possédant une bêta-glucuronidase et croissant à 44 °C.* » (Afssa 2007b). D'une manière générale, la recherche d'*Escherichia coli* comme témoin de la contamination fécale apparaît plus pertinente que celle des entérobactéries ou des coliformes totaux et fécaux. Il est donc recommandé de privilégier ce critère au critère « entérobactéries à 30 °C », quand l'objectif est d'évaluer la contamination d'origine fécale d'un aliment (Afssa 2007b).

² Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005, concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, modifié.

³ Note DGAI/SDSSA/N2010-8245, du 23 août 2010 modifiant la note DGAI/SDSSA/N2008-8009, relative aux modalités de mise en œuvre des analyses microbiologiques des denrées alimentaires et d'exploitation des résultats.

4.2.3. Niveaux des indicateurs d'hygiène des procédés et présence de bactéries pathogènes

Une corrélation entre la présence de bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Campylobacter*) et le taux de contamination par des indicateurs d'hygiène des procédés a parfois été montrée sur les carcasses ou dans les viandes (Ghafir, China *et al.* 2008; Lindblad, Lindmark *et al.* 2007).

Toutefois, aucune donnée spécifique aux STEC pathogènes n'existant à ce sujet, il n'est pas possible à l'heure actuelle de corréler des niveaux élevés d'entérobactéries y compris d'*E. coli* à la présence de STEC pathogènes. En conséquence, quelle que soit la filière considérée, la recherche d'*E. coli* ne constitue pas en soi un critère pertinent pour la maîtrise des STEC pathogènes, en particulier pour ceux du sérotype O157 (glucuronidase négatifs) dont l'absence de glucuronidase empêche leur dénombrement sur le milieu préconisé (ISO 16649) pour *E. coli*. Par ailleurs, pour les STEC pathogènes non-O157 et glucuronidase positifs, leurs particularités métaboliques, le plus souvent liées au sérotype considéré, suggèrent que leur croissance sur ce type de milieu reste fortement aléatoire (Posse, De Zutter *et al.* 2008).

La contamination des viandes bovines par des STEC pathogènes demeure un événement rare. Les méthodes permettant de rechercher aisément l'ensemble des sérogroupes bactériens regroupés sous la dénomination de STEC pathogènes ne sont pas encore toutes disponibles. Pour ces deux raisons, il n'est toujours pas pertinent de définir un critère de sécurité spécifique des STEC pathogènes. L'absence de critère réglementaire ne signifie pas pour autant que ce danger n'est pas à prendre en compte dans le cadre des autocontrôles car, dans ces principes généraux, le Règlement (CE) n°178/2002 précise qu'aucune denrée alimentaire ne doit être mise sur le marché si elle est dangereuse.

Cependant, même si la présence de STEC pathogène dans un aliment n'est pas corrélée aux concentrations des indicateurs usuels, l'application des critères d'hygiène des procédés doit permettre la maîtrise de l'hygiène et particulièrement celle d'une éventuelle contamination fécale. Du fait des caractéristiques propres à la méthode ISO 16649, il n'existe actuellement pas de meilleur indicateur d'hygiène des procédés pour suivre la contamination fécale que celui concernant *E. coli* (possédant une bêta-glucuronidase et croissant à 44 °C), tel que défini dans le Règlement (CE) N°2073/2005 modifié.

4.3. Concernant les connaissances disponibles et les recommandations pour la mise en place d'études pour compléter l'appréciation quantitative des risques (AQR) liés à O157:H7, initiée par l'Afssa en 2007.

Une première appréciation quantitative des risques (AQR) liés à O157:H7 « dans les steaks hachés surgelés consommés en restauration familiale en France par les enfants de moins de 16 ans » a été menée par l'Afssa (Afssa 2007a). Ce rapport souligne le manque de données disponibles concernant la contamination des animaux et des viandes par les STEC pathogènes aux différentes étapes de la chaîne alimentaire (i.e. élevage, abattage, hachage, conditionnement, mode de préparation des différents produits). Afin de compléter la première AQR réalisée en 2007 par l'Afssa, un bilan des connaissances scientifiques acquises dans ce domaine est présenté ci-après afin de formuler les recommandations attendues. De nombreuses informations complémentaires pourraient être collectées à chaque étape de la chaîne (Figure 1). Il est donc essentiel de préciser que les informations et les étapes identifiées ci-après sont limitées à celles qui permettent d'améliorer et rendre plus fiable la démarche AQR envisagée.

4.3.1. De l'élevage à l'abattoir:

- **Présence de STEC pathogènes dans les matières fécales bovines**

En France, il existe une étude portant sur la prévalence dans les matières fécales d'*E. coli* O157 (Andral, Aspan *et al.* 2004). Dans cette étude, réalisée dans trois abattoirs situés dans le Massif Central et dans le Rhône entre 1998 et 2001, *E. coli* O157 a été retrouvée dans cinq échantillons de matières fécales sur 201 (2,5%).

Ces résultats sont cohérents avec les prévalences observées dans les autres pays européens (Tableau 1). Les données présentées ci-dessous montrent des prévalences dans les matières fécales comprises entre 0 et 16%.

Il est connu que de nombreux facteurs influencent la prévalence d'*E. coli* O157 chez les bovins, dont les plus importants sont le mode d'élevage, l'âge ou encore la saison (Boqvist, Aspan *et al.* 2009; Cobbaut, Berkvens *et al.* 2009; Rhoades, Duffy *et al.* 2009). Toutefois dans l'état actuel des connaissances, il est difficile de relier quantitativement ces facteurs à la prévalence de ces bactéries pathogènes, compte-tenu de biais méthodologiques existant entre les différentes études (seuil de détection, spécificité, etc.). Une autre limite à la comparaison de ces résultats résulte des différentes méthodologies d'enquête mises en œuvre.

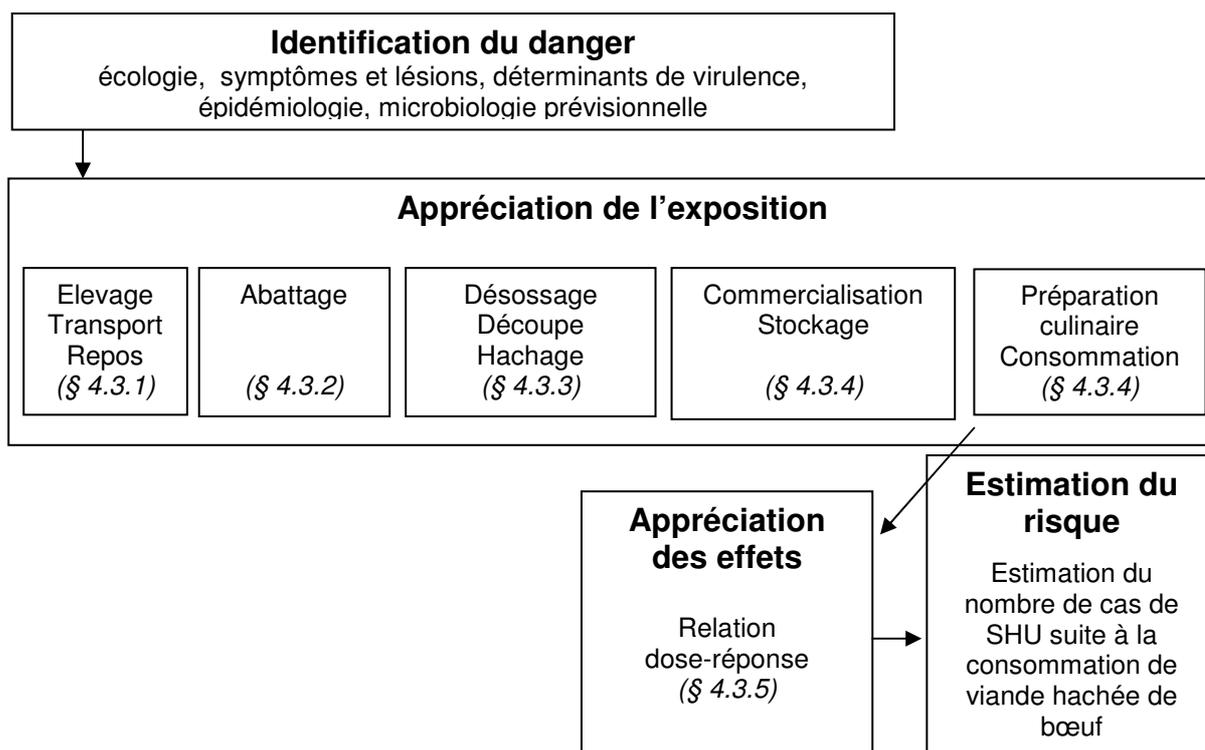


Figure 1 : Représentation schématique du processus de modélisation des étapes de la chaîne alimentaire, de l'élevage au consommateur, dans un objectif d'appréciation quantitative des risques liés à la consommation de viande hachée de bœuf (terminologie employée selon la norme NF V 01-002).

Tableau 1 : Synthèse des études sur la prévalence d'*E. coli* O157 dans les matières fécales des bovins, dans les pays européens autres que la France, d'après (Anses 2010).

Pays	Lieu	Période	Type d'animaux	N	%
Espagne	19 élevages	1993-1994	Vaches laitières	525	0
Espagne	abattoir	1998-1999	Bovins	383	1,8
Pays-Bas	10 fermes	1995-1996	Vaches laitières	1152	6,5
Pays-Bas	5 abattoirs	1995-1996	Bovins adultes	540	10,6
Slovénie	abattoir	1996-1997	Bovins adultes	250	0,8
Danemark	60 élevages	Aout à octobre 1997	Vaches	957	2,4
République Tchèque	1 élevage	Octobre 1997 à Septembre 1998	Taurillons	48	6,2
Italie	1 élevage	Avril 1996 à mars 1997	Génisses (laitières)	1293	10,7
Norvège	3 abattoirs	Janvier 1998 à décembre 1999	Bovins adultes	1541	0,2
Italie	1 abattoir	Avril 1997 à janvier 1998	Bovins à l'engraissement	223	16,6
Suisse	120 élevages	2002 et 2003	Vaches laitières	137	16,1
Irlande	1 Abattoir	Juin 1998 à mai 1999	Vaches laitières	892	4,6
Ecosse	952 élevages	1998-2000	Bovins adultes	250	2,4
Grande-Bretagne	118 abattoirs	1998-2000	Bovins à l'engraissement	14856	7,9
Grande-Bretagne	1 abattoir	Janvier 1999 à février 2000	Bovins	3939	4,7
Grande-Bretagne	1 abattoir	Avril 1995 à mars 1996	Bovins	4800	15,7
Grande-Bretagne	1 abattoir	Avril 1997 à mars 1998	Bovins	4800	12,9
Finlande	14 abattoirs	Avril 1997 à mars 1998	Bovins	1448	1,3
Ecosse	1 abattoir	Juin à décembre 1997	Bovins	1448	1,3
Irlande du Nord	7 abattoirs	Mai à juillet 2002	Bovins	589	7,5
Suède	15 abattoirs	Mai à juin	Bovins	220	0,9
Suède	15 abattoirs	Mai à juin	Jeunes bovins	876	3,5
Suède	15 abattoirs	2005-2006	Bovins adultes	750	1,6
Espagne	1 élevage	Mai à juin 2007	Bovins adultes	268	2,6
Serbie	3 abattoirs	Hiver-Printemps	Bovins adultes	115	2,6

N, nombre de bovins prélevés ; %, pourcentage de bovins pour lesquels le sérotype *E. coli* O157 a été détecté dans les matières fécales.

- **Présence de STEC pathogènes dans le rumen.**

Le rumen peut également être une source de contamination des carcasses. Deux études caractérisent la prévalence dans le rumen au regard des prévalences fécales. En Irlande, McEvoy *et al.* ont observé une prévalence pour *E. coli* O157 de 0,8 % dans le rumen contre 2,4 % dans les matières fécales (McEvoy, Doherty *et al.* 2003). On peut également noter l'étude de Van Donkersgoed *et al.* pour laquelle la prévalence était de 0,8 % dans le rumen contre 7,5 % dans les matières fécales (Van Donkersgoed, Graham *et al.* 1999).

- **Présence de STEC pathogènes sur le pelage de bovins**

Andral *et al.* ont caractérisé la prévalence d'*E. coli* O157 sur les oreilles et le pelage de bovins à l'abattoir. La prévalence était de 13,3% sur les oreilles (N=946) et de 6,9% sur le pelage (N=175) (Andral, Aspan *et al.* 2004). Les données de prévalence d'*E. coli* O157 sur le pelage des bovins, observées dans les autres pays européens, sont synthétisées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Synthèse des études sur la prévalence d'*E. coli* O157 sur le pelage des bovins dans les pays européens autres que la France, adapté d'après (Anses 2010).

Pays	Lieu	Période	Zone de prélèvement	Surface	N	%
Grande-Bretagne	3 abattoirs	juillet à août	pointe de poitrine	100 cm ²	90	22
Ecosse	11 abattoirs	2002-2004	pointe de poitrine	?	236	55
Serbie	abattoir	-	?	200 cm ²	30	37
Irlande	abattoir	Octobre 2001 à mars 2003	Arrière train	122 cm ²	1500	7,3
Serbie	3 abattoirs	Janvier à avril 2007	Présence sur 1 ou + parmi 5 zones	100 cm ²	71	20,8
Suède	15 abattoirs les plus importants	2005-2006	oreille	65 cm ²	446	12

N, nombre de bovins prélevés ; %, pourcentage de bovins pour lesquels le sérotype *E. coli* O157 a été détecté sur le pelage.

Ces études conduites en Europe, montrent que les prévalences sur le pelage des animaux sont plus élevées que dans les matières fécales. Cette différence entre pelage et matières fécales est confirmée par de nombreuses autres études notamment en Amérique du Nord (Arthur, Keen *et al.* 2009; Rhoades, Duffy *et al.* 2009; Stephens, McAllister *et al.* 2009; Wells, Shackelford *et al.* 2009) et s'explique par le fait qu'un animal peut contaminer son pelage et celui de ses voisins.

- **Concentrations d'*E. coli* O157**

Concernant les taux de contamination sur le pelage ou dans les matières fécales, la synthèse réalisée dans le rapport de l'Anses sur les « *Contaminations microbiologiques des viandes à l'abattoir* » montre qu'il est possible de caractériser la variabilité et l'incertitude de ces niveaux de contaminations (Anses 2010). Ces données pourraient être utilisées dans le cadre d'une modélisation des transferts de ces bactéries pathogènes du pelage et/ou des matières fécales vers la carcasse.

- **Transport et repos avant abattage**

Plusieurs études récentes (Fox, Renter *et al.* 2008; Mather, Innocent *et al.* 2007; Mather, Reid *et al.* 2008; Rhoades, Duffy *et al.* 2009) ont démontré l'impact du transport et du repos des animaux avant abattage sur l'augmentation de la prévalence sur le pelage des bovins. L'étude de Mather *et al.* est la plus illustrative (Mather, Reid *et al.* 2008). Plusieurs prélèvements étaient effectués sur les bovins : à la ferme (matières fécales) et à l'abattoir (pointe de poitrine, matières fécales et carcasses). Les souches étaient typées afin de pouvoir déterminer leur origine. Les auteurs ont montré que la prévalence sur le pelage des bovins était plus élevée à l'abattoir (55%) que sur les animaux à la ferme. Pour 84% des cas, les souches retrouvées sur un animal à l'abattoir n'avaient pas été détectées précédemment sur l'animal ou sur d'autres bovins appartenant à la même ferme.

En conclusion, les informations sur le portage digestif et cutané quand elles existent se limitent à *E. coli* O157, le plus souvent sans préciser le caractère pathogène des souches. Des études devraient être étendues à d'autres STEC pathogènes, et en particulier ceux des mêmes sérotypes que les EHEC typiques majeurs. Concernant les concentrations pour *E. coli* O157, les données de la littérature apportent la connaissance nécessaire à la modélisation de la variabilité et de l'incertitude des niveaux de contamination digestive et cutanée chez les bovins porteurs. Concernant la prévalence d'*E. coli* O157, celle-ci évolue en fonction des pratiques d'élevage, de transport et de repos avant abattage des bovins. Aussi, il serait nécessaire de caractériser la prévalence de portage digestif et cutané de STEC pathogènes des animaux arrivant à l'abattoir pour toute démarche de modélisation qui débiterait à partir de l'abattage.

4.3.2. Lors de l'abattage

- **De la contamination de l'animal à la contamination de la carcasse à l'abattoir**

L'étape de dépouille peut entraîner la contamination de la carcasse (incisions de la peau, retournement de la peau en cours de dépouille et contact du pelage avec des parties de la carcasse déjà mises à nu, contact entre carcasse non dépouillée et carcasse dépouillée, etc.). Les sites d'incision de la peau (zone abdominale, membres) semblent être les zones les plus fortement contaminées (Bell 1997; McEvoy, Doherty *et al.* 2003). L'incertitude sur la probabilité de passage des STEC pathogènes d'un animal porteur sur son pelage vers la carcasse est importante en l'état actuel des connaissances et dépend de la technicité des ouvriers sur la chaîne d'abattage et du degré de maîtrise de l'hygiène dans l'abattoir (Anses 2010).

L'éviscération représente une autre étape où la contamination de la carcasse est possible. En cas de portage digestif de STEC pathogènes, une contamination de la carcasse peut se produire si la ligature de l'œsophage et/ou l'ensachage du rectum n'ont pas été correctement réalisés ou lors d'une rupture ou perforation accidentelle de l'intestin durant l'éviscération (Anses 2010).

Les fréquences de ces différents événements de contamination et/ou la quantité de matières fécales associée peuvent être estimées (Anses 2010; Cummins, Nally *et al.* 2008; Kosmider, Nally *et al.* 2010; Nauta, Evers *et al.* 2001) mais elles restent soumises à une grande incertitude (Anses 2010).

D'autres sources de contamination (contact entre carcasses sur la chaîne d'abattage, transfert de contamination par le matériel) ont également été décrites (Anses 2010; Kosmider, Nally *et al.* 2010).

- **Efficacité des mesures de maîtrise et des actions correctrices**

Après l'ablation de la moelle épinière et la fente de la carcasse, si nécessaire, une excision au couteau (parage) est généralement effectuée pour retirer les zones visiblement souillées par du contenu digestif. Cette méthode est efficace pour retirer les souillures visibles et les contaminations microbiologiques associées, elle permet une réduction de l'ordre de 1 à 2 log₁₀ (Gill 2009; Gill and Bryant 1997). Un douchage en cabine ou l'utilisation d'un système combiné « vapeur / aspiration » montrent une efficacité du même ordre de grandeur que celle obtenue avec un parage (Anses 2010).

Au cours de la réfrigération des carcasses, la prévalence ou la concentration d'*E. coli* sur les carcasses peut augmenter, diminuer ou rester inchangée en fonction de l'humidité et d'autres paramètres comme la température et la vitesse de l'air (Gill 2009; Gill and Bryant 1997). Toutefois, l'amplitude de ces réductions ou augmentations reste limitée et inférieure à 1 log₁₀ (Cassin, Paoli *et al.* 1998; McEvoy, Doherty *et al.* 2003).

En conclusion, la modélisation de la contamination des carcasses par des STEC pathogènes à l'abattoir est possible en l'état actuel des connaissances. Toutefois la plupart des paramètres sont associés à des dires d'experts. L'estimation de l'incertitude sur certains paramètres pourrait être améliorée pour des étapes qui paraissent essentielles :

- meilleure évaluation du transfert du pelage ou du tube digestif vers la carcasse ;
- meilleure évaluation du transfert entre carcasses ;
- efficacité des mesures de maîtrise et des actions correctrices, en cas d'accident.

4.3.3. Lors de la découpe et du hachage

La contamination globale de la carcasse peut-être modélisée (Anses 2010) (Afssa 2010; Kosmider, Nally *et al.* 2010). Il est cependant difficile de définir précisément quels sont les morceaux de viande qui composeront les mêlées car cela est variable. Il demeure donc difficile de prendre en compte l'hétérogénéité du taux de contamination en fonction des différentes parties anatomiques de la carcasse, utilisées ou non pour la fabrication des viandes hachées. Selon les auteurs, cette contamination est considérée homogène et aléatoirement répartie sur la surface (Cummins, Nally *et al.* 2008; Kosmider, Nally *et al.* 2010; Nauta, Evers *et al.* 2001), ou au contraire sous forme d'agrégats (Cummins, Nally *et al.* 2008; Kosmider, Nally *et al.* 2010; Nauta, Evers *et al.* 2001).

La préparation des minerais (cubes de viande) en atelier de découpe doit permettre de réduire la contamination bactérienne par le retrait des parties superficielles des masses musculaires (retrait des aponévroses et parage), parties les plus contaminées au cours de la préparation des carcasses.

Concernant la découpe et le hachage, l'accent pourrait être porté sur la compréhension et la caractérisation des phénomènes de répartition de la contamination entre les différentes pièces de viande utilisées pour le hachage, malgré la grande variabilité des différentes pièces de viande utilisées pour la production des steaks hachés.

4.3.4. Lors de la commercialisation puis de la préparation et consommation des steaks hachés

Il existe de nombreux modèles destinés à prévoir la croissance ou la destruction des STEC pathogènes. Une synthèse de ces modèles avait été présentée en 2003 (Afssa 2003). Quelques publications importantes parues depuis peuvent également être citées pour la modélisation de la croissance (Membre, Leporq *et al.* 2005; Ross, Ratkowsky *et al.* 2003) et de la destruction (O'Bryan, Crandall *et al.* 2006; van Asselt and Zwietering 2006).

Compte-tenu de la température minimale de croissance des *E. coli*, la croissance est parfois négligée dans la modélisation de l'évolution de la contamination au cours de la conservation (Duffy, Cummins *et al.* 2006). Koutsoumanis a en outre montré que la conservation à une température insuffisamment basse des viandes hachées entraînait une altération rapide (Koutsoumanis 2009). L'altération est généralement atteinte avant d'avoir un développement important des *E. coli*.

Les données relatives au comportement des STEC dans divers conditionnements montrent que la composition de l'atmosphère influe peu sur leur comportement dans les viandes réfrigérées (Brooks, Alvarado *et al.* 2008; Uyttendaele, Jozwik *et al.* 2001).

Les travaux de Ou et Mittal (Ou and Mittal 2006; Ou and Mittal 2007) concernant la modélisation des transferts thermiques, qui permet d'évaluer la température en tout point d'une pièce de viande en fonction de l'épaisseur de la viande et de la température de la poêle, sont à souligner. Il reste toutefois à relier les pratiques des consommateurs (aspects qualitatifs) aux paramètres de ce modèle thermique (aspects quantitatifs).

Nauta *et al.* (Nauta, Fischer *et al.* 2008) ont récemment montré que la nature de l'information relative à la préparation d'un aliment destiné à des consommateurs pouvait avoir des conséquences sur le risque associé à ces aliments. D'autres travaux montrent que l'information donnée aux consommateurs est une clef pour la maîtrise du risque (Havelaar, Brul *et al.* 2010; Lubber 2009; van Asselt, Fischer *et al.* 2009).

En France, les données disponibles sur les modalités de conservation chez le consommateur puis de préparation et de consommation des steaks hachés demeurent très parcellaires. Des sources potentielles d'information concernant la préparation et la consommation de steaks hachés sont les enquêtes de consommation des Français et en particulier les enquêtes INCA 99 et INCA 2, coordonnées par l'ANSES. Le contenu de ces enquêtes, présenté en annexe B, a permis d'identifier les données pertinentes à collecter sur les modalités de conservation, de préparation et de consommation des steaks hachés (Tableau 3).

Si la croissance ou la thermo-résistance de *E. coli* est bien connue, la température pendant la conservation des aliments ou celle réellement atteinte pendant leur cuisson sont plus difficiles à évaluer. De nombreuses données sont disponibles sur la consommation de steaks hachés. Néanmoins, certains aspects restent insuffisamment renseignés, en particulier en ce qui concerne les pratiques de préparation (décongélation éventuelle, mode de cuisson, protocole de cuisson, niveau de cuisson atteint « à cœur »). La réalisation d'études permettant de collecter de telles données doit être encouragée, notamment pour les steaks hachés consommés par les enfants de moins de 15 ans.

Tableau 3 : Synthèse des données disponibles concernant la préparation et la consommation des steaks hachés, selon les différentes études françaises précédemment menées.

Données disponibles selon les études	Etude bébés TNS Sofres 2005	Etude INCA 99		Etude INCA 2		Etude AQR STEC 2005	Besoin d'études complémentaires
		Enfants de plus de 3 ans	adultes	Enfants de plus de 3 ans	Adultes de moins de 80 ans		
Population étudiée	Enfants de moins de 3 ans	Enfants de plus de 3 ans	adultes	Enfants de plus de 3 ans	Adultes de moins de 80 ans	Enfants de moins de 16 ans	
Mode de conservation des steaks hachés	non	non		oui		non	+
Température de conservation	non	oui (pour un sous-échantillon, mesure de la température par l'enquêteur)		oui (pour les réfrigérateurs équipés d'un thermomètre, auto-déclaration)		non	+
Mode de préparation	non	non		oui (mais très peu renseigné)		non	+++ Décongélation Protocoles de cuisson
Niveau de cuisson	non	non	Niveau habituel de cuisson de la viande rouge (termes culinaires, incluant le cru)	non	oui : niveau habituel de cuisson du steak haché de bœuf (termes culinaires)	oui (planche photographique)	+++ Correspondance entre protocoles de cuisson et niveau de cuisson (température à cœur)
Consommation de viande crue	non			non	oui : consommation de viande bœuf crue (carpaccio, tartare) (différentes classes de fréquence)	oui	+
Quantités consommées	oui	oui		oui		non	-
Lieu de consommation	exclusion si repas pris en crèches et écoles	oui		oui		Domicile, collectivité	-

4.3.5. Modalités de recueil des informations épidémiologiques chez l'Homme pouvant servir pour une étude dose-réponse

- **Identification des personnes atteintes d'une infection à EHEC dans la population**

Une infection à EHEC peut entraîner des symptômes variés allant d'une diarrhée simple à des complications sévères comme le SHU. Comme avec d'autres maladies infectieuses, les étapes d'identification des personnes avec une infection à EHEC peuvent être représentées sur une pyramide (Figure 2). La base de cette pyramide est composée de l'ensemble des personnes de la population générale infectées par un agent pathogène donné. Les niveaux suivants sont composés des patients symptomatiques parmi les personnes infectées, puis de la fraction de ces patients qui consultent un médecin, puis de la fraction des consultants pour lesquels une recherche de l'agent est effectuée, puis de la fraction pour lesquels l'agent pathogène est mis en évidence (« cas confirmés ») parmi les recherches effectuées et finalement la fraction des « cas confirmés » pour lesquels une notification est faite aux systèmes de surveillance.

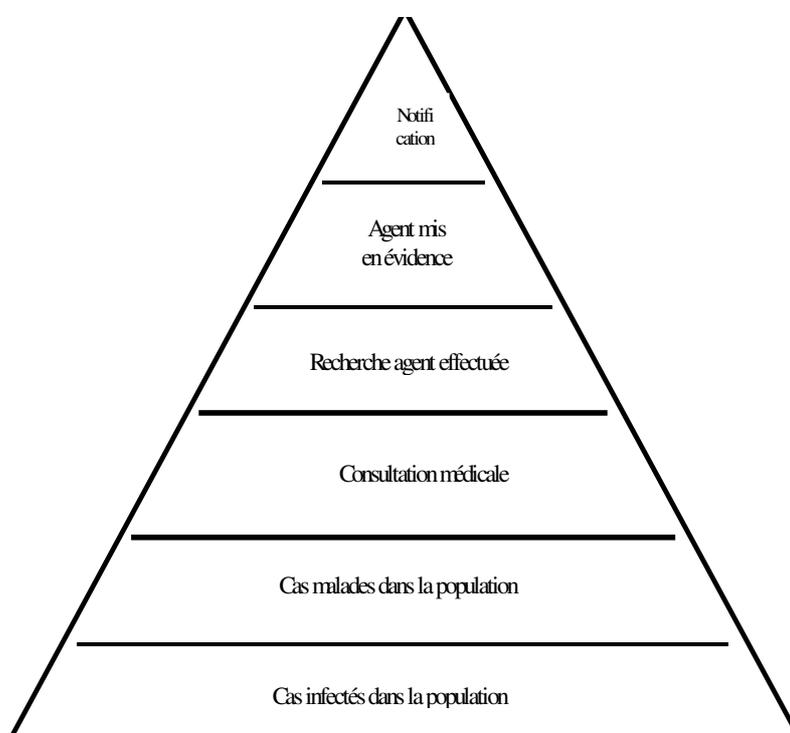


Figure 2 : Pyramide de détection et de notification des maladies (Vaillant, de Valk *et al.* 2005).

Pour estimer le nombre réel d'infections à EHEC en population générale, des informations sur chaque niveau de la pyramide sont nécessaires. Pour la majorité des agents, dont les EHEC, il n'existe pas de données exploitables sur les facteurs « multiplicateurs inter-niveaux » et les estimations se situent majoritairement au niveau des cas confirmés.

Une étude coordonnée par l'InVS avec l'objectif d'estimer l'incidence des gastro-entérites aiguës dans la population générale en France métropolitaine et le recours aux soins des cas de gastro-entérite aiguë est actuellement en cours. Elle permettra en particulier, à partir des données recueillies sur le recours aux soins, de décrire la relation cas confirmés / cas médicalisés / cas dans la population et ainsi d'estimer les facteurs de correction à appliquer aux données de surveillance existantes pour apprécier de façon plus adéquate l'impact de la maladie dans la population. Elle vise l'ensemble des gastro-entérites aiguës et n'est pas focalisée sur un agent pathogène particulier.

- **Surveillance actuelle des infections à EHEC en France**

Un réseau de surveillance du SHU chez l'enfant de moins de 15 ans coordonné par l'InVS a été mis en place en avril 1996 en collaboration avec la Société de néphrologie pédiatrique. Trente et un services de pédiatrie, néphrologie pédiatrique et réanimation pédiatrique de centres hospitaliers universitaires et généraux, répartis sur l'ensemble du territoire métropolitain participent au recensement des cas sur la base du volontariat. Ce réseau est animé par l'InVS de manière active avec l'envoi de relances tous les quatre mois.

Cette surveillance est complétée par la participation du Centre national de référence (CNR) des *E. coli* et *Shigella* et du laboratoire associé au CNR depuis 2002. La transmission à l'InVS de chaque cas d'infection à EHEC, détecté par le CNR et son laboratoire associé, permet à la fois la confirmation des cas notifiés par le réseau et également l'identification d'infections à EHEC en complément des cas du réseau SHU : c'est-à-dire des SHU hospitalisés dans les services ne faisant pas partie du réseau de surveillance mis en place et des infections à EHEC survenant dans la communauté.

La surveillance est également complétée par la déclaration obligatoire des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) qui permet l'identification des TIAC à EHEC, avec ou sans cas de SHU.

- **Une surveillance plus exhaustive des infections à EHEC : pertinence et faisabilité**

Actuellement la surveillance des infections à EHEC, hors contexte SHU et TIAC, repose sur l'envoi des souches d'EHEC présomptives au CNR *E. coli* et *Shigella* et son laboratoire associé par des laboratoires d'analyse de biologie médicale. Ce dispositif pourrait être amélioré par l'augmentation du nombre de laboratoires envoyant leurs souches d'EHEC présomptives au CNR et par un envoi systématique des souches d'EHEC présomptives isolées par ces laboratoires. Une telle démarche pourrait améliorer à la fois la représentativité et l'exhaustivité des données sur les EHEC disponibles au CNR.

Une étude de faisabilité d'extension de la surveillance du SHU à la surveillance des infections à EHEC a été réalisée en 2004 (InVS 2006). Elle a montré que la recherche d'EHEC dans les selles n'était pas effectuée en routine dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale. Seulement 36% des laboratoires ayant répondu ont déclaré avoir recherché *E. coli* O157 en 2003. Ceux qui avaient réalisé cette recherche ne la réalisaient pas systématiquement mais se limitaient à des situations précises (gravité, cas groupés).

Les principales raisons citées par les laboratoires ne réalisant pas la recherche des EHEC étaient la non disponibilité et la méconnaissance des techniques, le peu de connaissances sur l'importance des infections à EHEC chez l'homme, et l'absence de demande spécifique des cliniciens. La situation était encore plus compliquée concernant la recherche des souches d'EHEC non-O157, due à l'absence de stratégies d'isolement efficaces pour ces souches et à des coûts supplémentaires.

Un élément qui pourrait freiner une extension de la surveillance des infections à EHEC serait la rareté de la maladie. Une étude a été réalisée à l'Hôpital Robert Debré sur les étiologies bactériennes des cas de diarrhée infectieuse chez des enfants se présentant aux urgences de l'hôpital entre 2000 et 2009. Une coproculture a été réalisée avec recherche d'EHEC pour chaque enfant présentant des selles glaireuses ou glairo-sanglantes (22% des cas). Parmi les 11 280 enfants (<15 ans), une étiologie bactérienne a été retrouvée uniquement dans 10% des cas (1 147 enfants). Les bactéries retrouvées sont par ordre d'importance : *Salmonella* sp. (42 %), *Campylobacter* sp. (32%), *Shigella* sp. (19%), EPEC (2,7%) et EHEC (2,3%). Les résultats de cette étude suggèrent que les infections à EHEC sont une étiologie rare chez les enfants avec une diarrhée sanglante (Mariani P., Laboratoire associé au CNR, communication personnelle).

Les résultats de l'étude de l'Hôpital Robert Debré sont cohérents avec ceux de deux études menées à l'échelon national en Angleterre et aux Pays Bas qui ont montré que les EHEC sont une étiologie rare de gastro-entérite aiguë dans la population générale (de Wit, Koopmans *et al.* 2001; Wheeler, Sethi *et al.* 1999). Par ailleurs, une étude de la population française, ayant pour objectif d'évaluer la fréquence de certaines bactéries entéropathogènes identifiées lors d'entérite chez les patients, a été menée auprès de 14 laboratoires d'analyses de biologie médicale dans 10 régions entre 1999 et 2000 (Weber, Laudat *et al.* 2003). Une bactérie entéropathogène a été isolée de 5,3% des 4 838 coprocultures analysées, dont uniquement trois EHEC:O157.

La mise en place d'un dispositif de surveillance plus exhaustif pour les infections à EHEC nécessiterait une amélioration des connaissances sur les infections à EHEC chez l'homme, de la part des médecins et des biologistes, de façon à ce qu'une recherche spécifique d'EHEC soit prescrite et réalisée chez les enfants présentant une diarrhée sanglante. Sans une telle amélioration, une extension de la surveillance des infections à EHEC ne fournirait que des informations limitées par rapport à ce qui existe déjà.

- **Éléments épidémiologiques pour une étude de la relation dose-réponse**

Les cas isolés d'infection à EHEC ne sont habituellement pas pris en compte dans les études de la relation dose-réponse. En effet, à cause de la multiplicité des sources de contamination possibles et de la multiplicité des modes de transmission de ces bactéries pathogènes, l'investigation d'un cas isolé d'infection à EHEC ne permet généralement pas de déterminer la source de son infection.

Afin de pouvoir inclure dans une étude de la relation dose-réponse des personnes ayant développé une infection à EHEC suite à la consommation d'un aliment contaminé par un STEC pathogène, il faut identifier des cas pour lesquels une source de contamination a été confirmée par des analyses épidémiologiques et microbiologiques. Ceci nécessite dans un premier temps l'identification des infections à EHEC regroupées dans le temps et l'espace avec une exposition alimentaire commune. La confirmation d'une source alimentaire implique l'isolement d'une souche EHEC chez les malades et dans l'aliment contaminé et la comparaison moléculaire des souches humaines et alimentaires permettant d'établir si elles sont génétiquement reliées ou non. Les conditions nécessaires pour pouvoir confirmer la source de contamination et le mode de transmission sont réunies durant les épidémies de SHU ou d'infections à EHEC et durant certaines TIAC. Ces deux phénomènes font l'objet d'une surveillance et d'une investigation suite à leur identification.

Afin d'établir une relation dose-réponse complète pour un agent pathogène et un aliment, il faut prendre en compte l'ensemble des manifestations cliniques y compris les formes non sévères. C'est ce qui est fait lors de l'investigation des épidémies et des TIAC à EHEC, où une recherche active des cas est réalisée, conduisant à l'identification des cas ayant des formes cliniques moins sévères. L'investigation de l'épidémie à EHEC O157:H7 survenue en 2005 a permis d'identifier en plus des 17 cas de SHU, 52 personnes ayant développé une diarrhée ou une diarrhée sanglante suite à la consommation des steaks hachés incriminés (King, Mailles *et al.* 2009). L'investigation de la TIAC familiale à EHEC O123:H2 survenue en 2009 a également permis d'identifier un enfant présentant une diarrhée simple en plus de l'enfant présentant un SHU. Ces observations soulignent l'intérêt des investigations des cas groupés pour fournir des informations sur les formes non-sévères d'infection à EHEC pouvant contribuer à une étude de la relation dose-réponse. De plus, pour pouvoir établir cette relation dose-réponse des informations complémentaires doivent être recueillies :

- la recherche des consommateurs du produit incriminé ne présentant pas de signes cliniques ;
- le dénombrement des bactéries pathogènes dans l'aliment incriminé ;
- les modalités de préparation et de consommation de l'aliment incriminé.

Le SHU est la forme clinique sévère d'une infection à EHEC. Les jeunes enfants, notamment ceux âgés de moins de 5 ans, et les personnes âgées sont particulièrement vulnérables à une évolution clinique d'une infection à EHEC vers un SHU. La vulnérabilité observée de certaines tranches d'âge témoigne du rôle majeur des facteurs physiopathologiques dans l'évolution clinique de l'infection.

En considérant la multiplicité des sources de contamination et des modes de transmission possibles pour ces bactéries pathogènes, l'investigation d'un cas d'infection à EHEC ou de SHU isolé ne permet qu'exceptionnellement de déterminer avec certitude une source de contamination. Ainsi, sans la détermination confirmée de celle-ci par une preuve microbiologique, l'élaboration d'une relation dose-réponse n'est pas possible pour un cas isolé.

Selon la littérature, la détermination d'une relation dose-réponse, pour une matrice alimentaire et un effet néfaste sur la santé donnés, s'effectue à partir des épidémies pour lesquelles une source de contamination a été mise en évidence avec quantification de la contamination de cette source. Pour pouvoir déterminer les relations dose-réponse complètes des différents effets cliniques observés pour un couple bactérie pathogène-matrice alimentaire, des informations doivent aussi être recueillies sur des personnes infectées présentant des formes cliniques bénignes qui sont souvent plus difficiles à repérer que des personnes présentant des infections sévères.

Au total, seule l'investigation poussée des épidémies d'infections à EHEC avec une source de contamination alimentaire confirmée, comprenant notamment la détermination de la charge microbienne contaminant les aliments incriminés et l'identification du maximum possible de personnes présentant une forme bénigne de l'infection, permet d'acquérir des données épidémiologiques utiles pour établir les relations dose-réponse.

4.4. Concernant les caractéristiques de contamination d'un lot de steak haché, issu d'une mée de viande hachée contaminée par les « EHEC majeurs typiques », pouvant conduire aux différentes formes épidémiologiques du SHU

Dans le cadre de la gestion des risques liés à la consommation de steaks hachés contaminés par des STEC hautement pathogènes (Afssa 2010), la DGAL s'interroge sur la possibilité de définir des plans d'échantillonnage permettant d'exclure du marché des lots de steaks hachés pouvant conduire à certaines formes épidémiologiques du SHU appelées « cas groupés ». Pour répondre à cette demande, un modèle a été développé pour :

- établir le lien entre les caractéristiques de contamination d'un lot et le nombre de cas de SHU attendus ;
- déterminer le plan d'échantillonnage optimal pour le rejet des types de lots incriminés, en fonction des caractéristiques établies dans l'étape précédente.

Le calcul du risque ne s'applique ici qu'aux consommateurs de moins de 15 ans.

4.4.1. Structure générale du modèle

La fabrication des steaks hachés comprend les 4 étapes suivantes :

- la réception des viandes : les viandes réceptionnées proviennent en général de différentes carcasses d'animaux et d'ateliers de découpe différents ;
- la formulation (hachage et mélange) : deux types de viandes, l'une maigre et l'autre plus grasse, sont le plus souvent mélangés avec des proportions permettant une préparation optimale en termes de texture, de goût, de taux de matières grasses et de rapport collagène / protéines totales (après un premier hachage grossier, la viande est mélangée puis hachée plus finement) ;
- le fromage ;
- le conditionnement.

La figure 3 présente la complexité de la filière, la diversité de l'origine des viandes entrant dans la fabrication des steaks hachés et l'importance d'une bonne traçabilité. De plus, pour compléter le suivi des steaks hachés jusqu'à leur consommation, il faudra disposer des différents scénarios de conservation et de cuisson, des quantités consommées et de la relation dose-réponse.

Pour répondre au questionnement du gestionnaire sur les caractéristiques des lots, un modèle probabiliste a été développé, qui modélise le nombre de cas de SHU attendus en fonction des caractéristiques de contamination d'une mêlée de viande (figure 4).

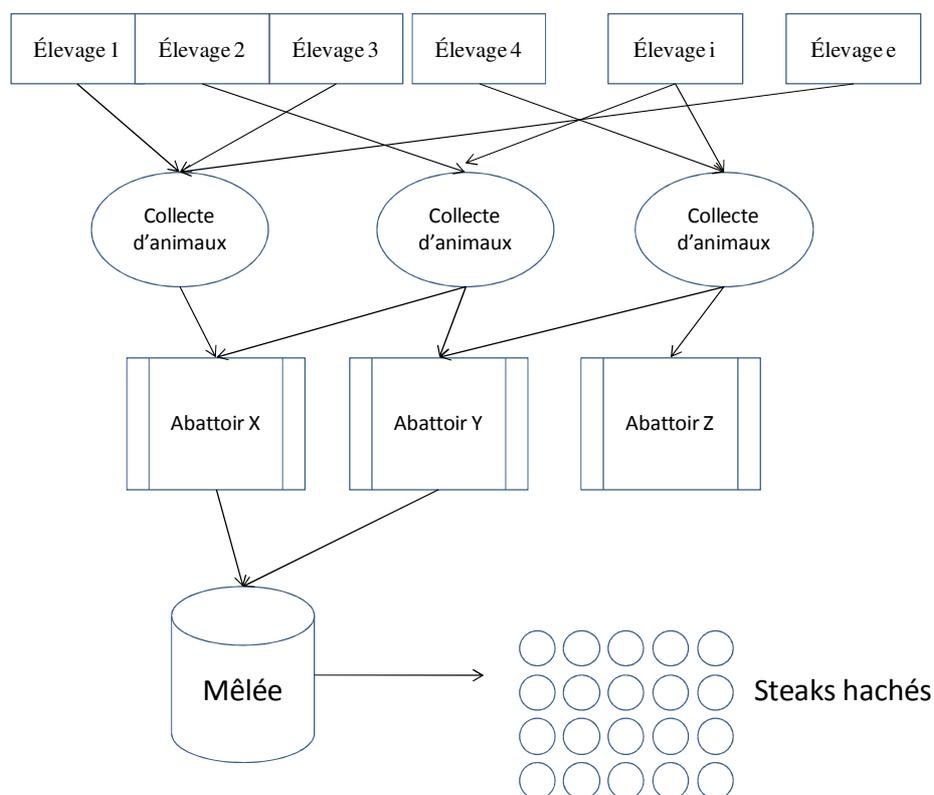


Figure 3: Origine des viandes rentrant dans la fabrication des steaks hachés

Par souci de simplification, n'ont pas été portées sur la figure ci-dessus, les étapes de découpe et de désossage des carcasses provenant des abattoirs en atelier de découpe, permettant d'obtenir les morceaux utilisés pour le hachage et l'obtention de la mêlée en atelier de fabrication de viandes hachées.

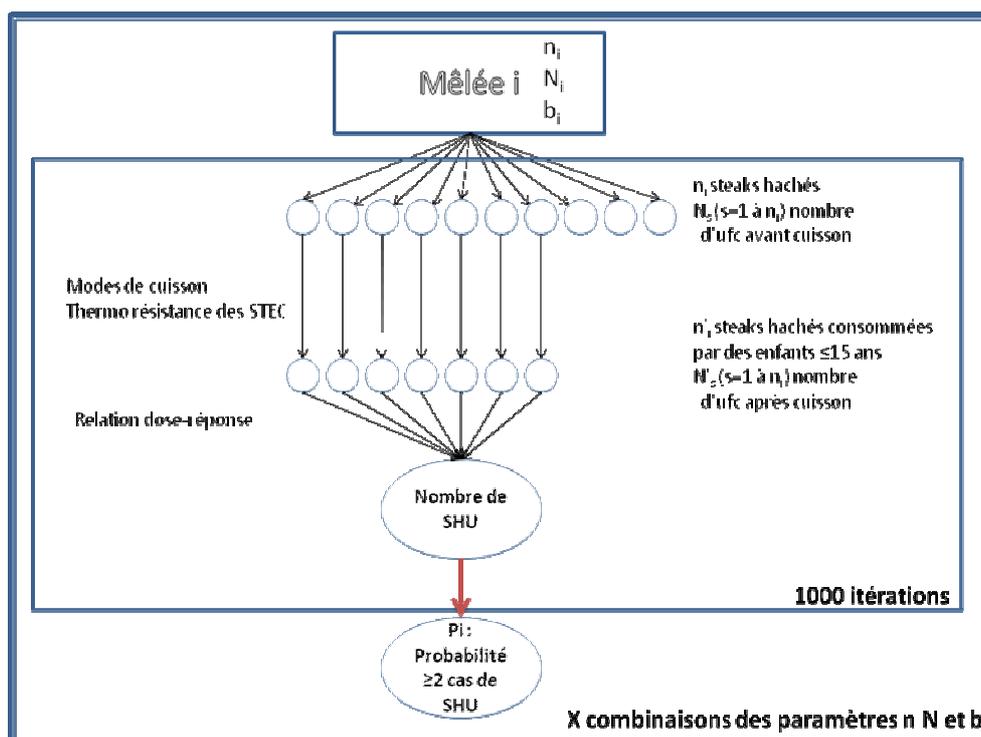


Figure 4: Structure générale du modèle probabiliste

N : Nombre d'ufc de STEC total dans la mēlée, n : nombre de steaks hachés par mēlée, b : facteur d'homogénéité de la répartition des ufc dans la mēlée. Les indices i correspondent à une combinaison des valeurs n, N, b.

Le modèle retient les hypothèses et les simplifications suivantes :

- l'unité d'intérêt du modèle est la mēlée ;
- une mēlée est caractérisée par les paramètres suivants :
 - o **n** : nombre de steaks hachés de 125 grammes fabriqués par mēlée ;
 - o **N** : nombre d'unités formant une colonie (ufc) de STEC dans la mēlée ;
- la mēlée est composée de morceaux de viandes provenant de plusieurs animaux abattus dans un même ou dans différents abattoirs, la probabilité et le niveau de contamination des morceaux varient en fonction du statut de l'animal (porteur / non porteur de souches STEC) et de l'application des bonnes pratiques d'hygiène dans les abattoirs et les ateliers de découpes dont sont issus les morceaux constituant la mēlée ;
- seul un petit nombre de morceaux de viande contribue à la contamination de la mēlée ;
- il n'y a pas de transfert de contamination d'une mēlée à une autre ;
- le hachage et le mélange à froid des viandes ne permettent pas toujours d'obtenir une répartition uniforme des STEC dans la mēlée. Un paramètre d'homogénéité de la répartition des ufc dans la mēlée est défini, il est noté **b**. Plus b est grand, plus les ufc sont réparties de façon homogène ;
- la répartition des ufc est considérée homogène au sein d'un même steak haché contaminé ;
- la possibilité de croissance des STEC avant la cuisson des steaks hachés est négligée ;
- une proportion de steaks hachés provenant d'une même mēlée sera consommée par les enfants de moins de 15 ans. On suppose l'absence de fabrication de mēlées spécifiques à une classe d'âge donnée ;
- la répartition des modes de cuisson (saignant, à point et bien cuit) est spécifique aux classes d'âge ;
- tous les steaks hachés d'une mēlée sont consommés sur le territoire national ;
- chaque steak haché est supposé entièrement consommé par une même personne ;
- une seule relation dose-réponse est utilisée pour les enfants de moins de 15 ans ;
- le nombre de cas attendus est calculé par mēlée ;
- on calcule la probabilité d'observer au moins deux cas de SHU par type de mēlée caractérisée par les paramètres : n, N et b ;
- le présent modèle n'a pas pour objectif d'estimer le risque d'observer deux cas groupés de SHU suite à la consommation de steaks hachés issus d'un même lot mais de décrire l'impact relatif des caractéristiques de la mēlée sur ce risque. Afin de faciliter cette étude, les incertitudes sur les paramètres, tels que

l'efficacité de la cuisson, la fréquence des modes de consommation et la relation dose réponse, n'ont pas été inclus dans le modèle.

Une lecture inverse des résultats permettra de définir les caractéristiques des lots pouvant conduire à des « cas groupés » de SHU.

S'agissant du paramètre b , une valeur élevée de ce paramètre peut être associée à une source de contamination continue durant l'abattage, la découpe, le hachage ou le formage des steaks hachés entraînant une répartition uniforme des ufc de STEC dans la viande hachée. A l'inverse, pour les petites valeurs de b , on peut penser à un mécanisme discontinu de largage des ufc de STEC aboutissant à une distribution non uniforme des ufc. On estime alors que si l'apport de ces bactéries est fait uniquement par quelques morceaux de viande utilisés pour la fabrication de la mûlée, les opérations de hachage ne sont pas capables de distribuer d'une façon homogène les ufc dans l'ensemble de la mûlée.

4.4.2. Points clés du modèle

- **Principe de partition**

Considérant une mûlée de viande hachée contenant N ufc de STEC, il s'agit de déterminer la distribution des ufc de STEC dans les n steaks hachés formés à partir de cette mûlée (figure 5). Le nombre d'ufc par steak haché dépendra de la répartition des ufc dans la mûlée avant l'opération de formage.

Pour illustrer le propos, l'hypothèse est choisie d'une contamination par 1 000 ufc de STEC de la mûlée considérée dans les exemples ci-après.

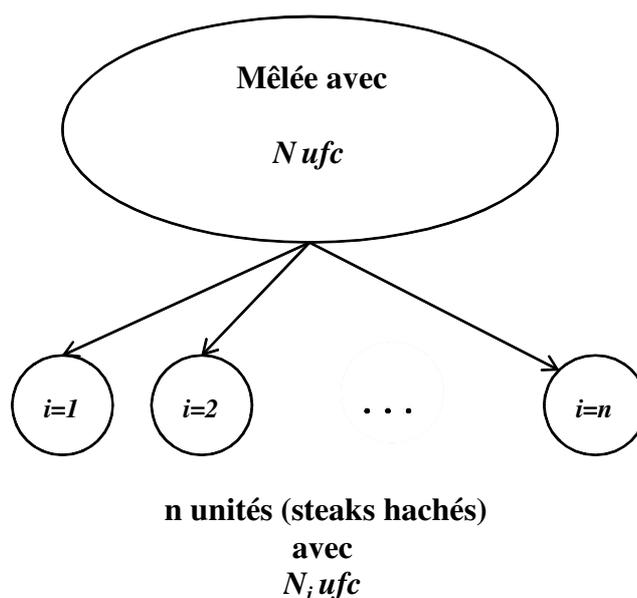


Figure 5 : Principe de partition

Hypothèse 1 : répartition aléatoire homogène

Sous l'hypothèse d'une répartition homogène, l'ensemble des ufc ont la même chance de se trouver dans n'importe quelle unité i . Ainsi, pour simuler la fabrication des steaks hachés, il est admis que le nombre d'ufc présentes dans le premier steak haché suit un processus binomial de paramètre : le nombre total d'ufc présentes dans la mûlée et de probabilité $1/n$. Pour le steak suivant, le nombre d'ufc suit une loi Binomiale de paramètres : le nombre total d'ufc dans la mûlée moins le nombre d'ufc du steak haché numéro 1 et la probabilité est de $1/(n - 1)$. Ce processus peut être généralisé à l'ensemble des rangs de fabrication des steaks hachés. Le nombre d'ufc suit une loi Binomiale de paramètres : le nombre total d'ufc initial moins le nombre d'ufc déjà distribué aux steaks hachés précédents et de probabilité égale à $1/(n - \text{rang du steak haché})$.

La figure 6 illustre ce processus de partition sous l'hypothèse d'homogénéité.

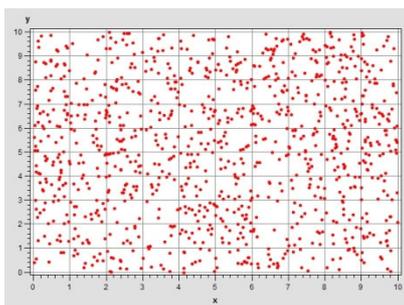


Figure 6 : Répartition de 1 000 ufc de façon homogène dans 100 unités (1 case=1 unité)

Hypothèse 2 : répartition aléatoire non homogène

Le processus de distribution par steak haché reste un processus binomial. Cependant, la probabilité de transfert d'une ufc de la mûlée vers le steak haché ne peut pas être considérée comme étant la même pour l'ensemble des ufc. Une des approches possibles est de faire varier cette probabilité de transfert selon une loi bêta. La loi bêta est largement utilisée pour décrire des variabilités de probabilité car elle est définie entre 0 et 1. La loi bêta a deux paramètres, dans ce modèle le premier paramètre est égal à b et le deuxième à $b \cdot (n - \text{rang du steak haché})$. Le paramètre b intervient ici comme un paramètre d'homogénéité de la distribution. Il est inversement proportionnel au niveau d'agrégation des ufc dans la mûlée avant formage des steaks. Quand b tend vers zéro on obtient le maximum d'hétérogénéité, quand b augmente et tend vers l'infini on s'oriente vers une homogénéité parfaite (distribution uniforme des ufc).

La figure suivante illustre la répartition des ufc en fonction du paramètre b :

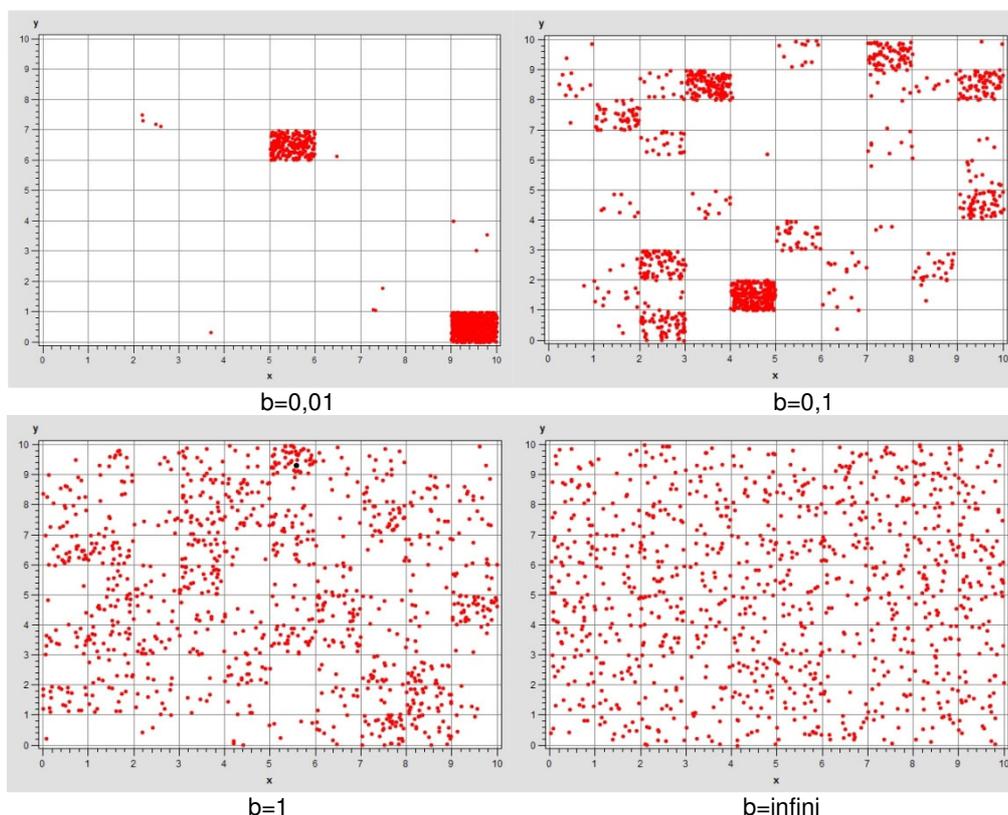


Figure 7 : Répartition de 1 000 ufc dans 100 unités (1 case=1 unité)

- **Proportion d'unités contaminées**

La proportion d'unités contaminées conditionne l'efficacité des plans d'échantillonnage, elle dépend à la fois du nombre total d'ufc dans la môle et du mode de répartition des ufc dans celle-ci. Ainsi, la fréquence de steaks hachés contaminés sera plus faible dans le cas d'une distribution non homogène des ufc que dans le cas d'une distribution homogène. La figure suivante présente des exemples de calculs du pourcentage d'unités contaminées en fonction de la taille de la môle (n) et du mode de distribution (b). Pour une même charge de STEC, le pourcentage de contamination augmente avec le degré d'homogénéité.

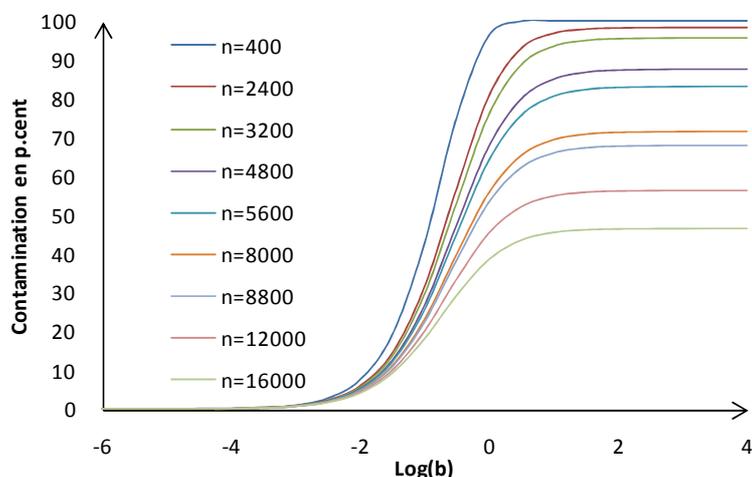


Figure 8: Pourcentage de steaks hachés contaminés par môle selon la taille du lot (n) et le degré d'homogénéité ($\log_{10}b$) pour une charge de STEC totale égale à 10 000 ufc.

L'ordre des courbes correspond à celui de la légende.

Les calculs du tableau 4 apportent une aide d'interprétation du facteur d'homogénéité. Par exemple pour une charge de STEC totale égale à 1 000 ufc, une distribution hétérogène ($b=0,1$) correspond pour une môle de 400 kg à 13,2% des steaks hachés contaminés, soit en moyenne 2,37 ufc par steak haché contaminé ($1\ 000/(0,132 \times 3\ 200)$). Une distribution homogène correspond alors à 26,8% des steaks hachés contaminés, avec une concentration moyenne de 1,17 ufc par steak haché contaminé.

Tableau 4: Approximation du pourcentage de steaks hachés contaminés par mêlée selon la taille du lot (n), la charge totale en ufc STEC (N) et le degré d'homogénéité (b). Exemple de lecture : pour une mêlée de taille 4 800 steaks hachés et une charge de 10 000 ufc, le pourcentage de steaks hachés contaminés peut varier entre 26,5 % et 87,5 % selon le mode hétérogène ou homogène de la répartition des ufc dans la mêlée.

Charge totale en ufc de STEC	Mode de répartition*	Taille de la mêlée (en kilogrammes)								
		50	300	400	600	700	1 000	1 100	1 500	2 000
		Taille de la mêlée (nombre de steaks hachés de 125 g)								
		400	2 400	3 200	4 800	5 600	8 000	8 800	12 000	16 000
100	Hétérogène	11,9	3,4	2,7	1,9	1,6	1,2	1,1	0,8	0,6
	Intermédiaire	20,0	4,0	3,0	2,0	1,8	1,2	1,1	0,8	0,6
	Homogène	22,1	4,1	3,1	2,1	1,8	1,2	1,1	0,8	0,6
1 000	Hétérogène	27,9	15,2	13,2	10,7	9,7	7,8	7,3	5,9	4,7
	Intermédiaire	71,5	29,4	23,8	17,2	15,2	11,1	10,2	7,7	5,9
	Homogène	91,8	34,1	26,8	18,8	16,4	11,8	10,7	8,0	6,1
10 000	Hétérogène	42,5	31,3	29,4	26,5	25,5	22,9	22,2	20,0	18,0
	Intermédiaire	96,2	80,7	75,8	67,6	64,1	55,6	53,2	45,5	38,5
	Homogène	100,0	98,4	95,6	87,5	83,2	71,3	67,9	56,5	46,5
100 000	Hétérogène	54,3	45,3	43,7	41,4	40,5	38,3	37,8	35,8	34,0
	Intermédiaire	99,6	97,7	96,9	95,4	94,7	92,6	91,9	89,3	86,2
	Homogène	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,8
1 000 000	Hétérogène	63,7	56,6	55,3	53,4	52,7	51,0	50,5	49,0	47,5
	Intermédiaire	100,0	99,8	99,7	99,5	99,4	99,2	99,1	98,8	98,4
	Homogène	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* : un mode hétérogène correspond à une valeur de b égale à 0,1, un mode intermédiaire à une valeur de b égale à 1. Le pourcentage est calculé à partir des formules suivantes (Nauta 2005), la première pour le mode homogène et la deuxième pour le mode non homogène :

$$(1) p = 1 - \left(1 - \frac{1}{n}\right)^N \quad (2) p = 1 - \frac{\Gamma(bn)\Gamma(N + b(n-1))}{\Gamma(b(n-1))\Gamma(bn + N)}$$

où $\Gamma(\)$ est la fonction gamma d'Euler, $\Gamma(x) = \int_0^{+\infty} t^{x-1} e^{-t} dt$

4.4.3. Destruction thermique durant la cuisson

On utilise les barèmes de destruction thermique déterminés dans le cadre de l'étude (Afssa 2007a).

Tableau 5 : Distribution du nombre de réductions décimales pour chaque mode de cuisson

Type de cuisson	Saignant	A point	Bien cuit
Loi* du nombre de réductions décimales	Unif(0 ; 0,9)	Unif(0,2 ; 1,4)	Unif(1,2 ; 2,8)

Unif= uniforme, entre parenthèses : minimum et maximum.

4.4.4. Relation dose réponse

Les relations dose-réponse pour *E. coli* O157:H7 ont été établies à partir de données d'infection expérimentale chez le lapin (Haas, Thayyar-Madabusi *et al.* 2000) et extrapolées à partir de données sur *Shigella dysenteriae* et *E. coli* entérotoxigène (Powel, Ebel *et al.* 2000). Cependant, ces modèles semblent sous-estimer le risque d'infection pour l'homme par *E. coli* O157:H7 (Teunis, Takumi *et al.* 2004). Nauta *et al.* et Strachan *et al.* proposent des relations dose-réponse exponentielles basées sur des données de cas groupés chez l'homme (Nauta, Evers *et al.* 2001; Strachan, Doyle *et al.* 2005). Les travaux menés par Deline-Muller *et al.* pour modéliser par classes d'âge le risque de SHU en fonction de la dose ingérée, reposaient sur des données obtenues lors d'une épidémie française de 2005. Différentes relations dose-réponse précédemment décrites dans la littérature ont été testées et deux modèles de forme différentes (exponentiel et exponentielle-Poisson) ont été proposés, dont les paramètres ont été estimés par classes d'âge (Deline-Muller and Cornu 2008).

La relation dose-réponse exponentielle de Strachan *et al.* avec le paramètre $r = 1.13 \times 10^{-3}$ a été retenue pour le modèle développé en réponse à cette saisine (Strachan, Doyle *et al.* 2005).

4.4.5. Consommation des steaks hachés

D'après les données disponibles dans la précédente étude de l'Afssa (Afssa 2007a), on peut retenir les pourcentages de consommation suivants :

- les enfants de 0 à 5 ans représentent 5,83% de la consommation totale de steaks hachés en France ;
- les enfants de 5 à 10 ans représentent 8,67% ;
- les enfants de 10 à 15 ans représentent 9,50%.

En ce qui concerne les modes de cuisson, la répartition présentée dans le tableau 6 peut être retenue (Afssa 2007a).

Tableau 6 : Répartition des modes de cuisson en fonction de l'âge des enfants

Mode de cuisson	Age		
	0 à 5 ans	5 à 10 ans	10 à 15 ans
Cru	0,00	0,01	0,01
Saignant	0,10	0,16	0,20
Rosé	0,41	0,53	0,54
Bien cuit	0,49	0,28	0,24
Total	1	1	1

4.4.6. Choix des combinaisons des caractéristiques des mêlées

Le modèle (figure 4) a été simulé pour 270 scénarios résultant des combinaisons des valeurs des trois paramètres suivants :

- pour N, charge en ufc STEC, 5 valeurs : 2, 3, 4, 5 et 6 Log₁₀ ufc ;
- pour n, nombre de steaks hachés par méele, 9 valeurs : 400, 2400, 3200, 4800, 5600, 8000, 8800, 12000 et 16000 ;
- pour b, degré d'homogénéité, 6 valeurs : 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 et 2.10⁶.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des entrées du modèle d'appréciation du risque de cas groupés de SHU.

Variable	Notation (unité)	Valeurs, distribution ou formule
Nombre total d'ufc par méele	N (log ₁₀ ufc)	Entre 2 et 6
Taille de la méele	n (steak haché)	Entre 400 et 16 000
Coefficient d'homogénéité	b	0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 2.10 ⁶
Probabilité qu'une ufc présente dans la méele se retrouve dans le steak i (i=1 à n)	P _i (ufc)	P _i ~ Bêta[b ; b x (n-i)]
Nombre d'ufc par steak haché	N _i (ufc)	N _i ≈ Binomiale $\left(P_i ; N - \sum_{j=1}^i N_j \right)$
Distribution des types de cuisson (saignant k=1, à point k=2 et bien cuit k=3)	P _k	P ₁ =0,162 P ₂ =0,500 P ₃ =0,338
Destruction thermique en fonction des types de cuisson	D _k (log ₁₀)	D ₁ ~ Uniforme [0 ; 0,9] D ₂ ~ Uniforme [0,2 ; 1,4] D ₃ ~ Uniforme [1,2 ; 2,8]
Nombre d'ufc par steak haché après cuisson	N _{c_i} (ucf)	N _{c_i} ~ Binomiale (10 ^{-DK} ; N _i)
Probabilité que le steak haché i soit consommé par un enfant de moins de 15 ans	P _c	0,24
Probabilité de tomber malade suite à la consommation du steak haché i	P _{m_i}	P _m =1 - (1 - 1,13 x 10 ⁻³) ^{N_{c_i}}
Probabilité moyenne de tomber malade	P _m	$P_m = \frac{P_c \times \sum_i P_{m_i}}{n}$
Probabilité d'observer 2 cas ou plus par méele	P _{m≥2}	Calculer à partir de la fonction de probabilité cumulative d'une loi de poisson de moyenne égale à P _m x n

4.4.7. Résultats des simulations

Les sorties du modèle de simulation sont la probabilité d'observer deux cas de SHU ou plus par lot et la prévalence (proportion de steaks hachés contaminés par lot).

- **Risque**

Considérant les hypothèses formulées précédemment, la figure suivante présente le risque d'observer deux cas de SHU ou plus en fonction de la charge microbienne (N), du degré d'homogénéité de la distribution des ufc de STEC (b) et de la taille du lot (n).

Les résultats montrent que le risque d'observer 2 cas de SHU ou plus dépend essentiellement de la charge microbienne.

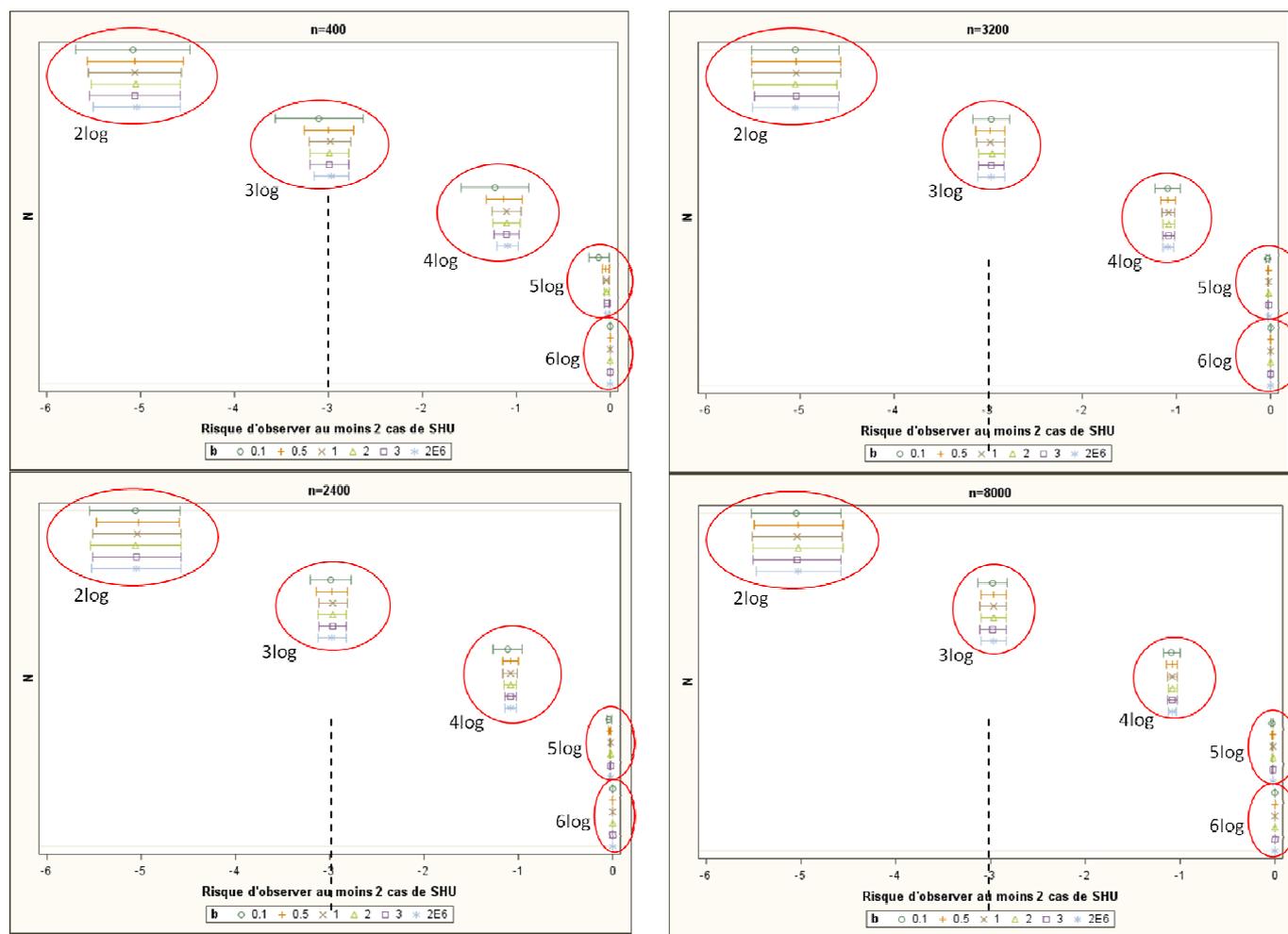


Figure 9: Risque d'observer au moins deux cas de SHU par mée (exprimé en logarithme décimal) en fonction de la taille de la mée (n), de la charge en ufc de STEC (N) et du degré d'homogénéité (b).

Exemple de lecture : Pour le graphique où la taille n de la mée est de 400 steaks hachés, on observe que pour une charge microbienne de $3 \log_{10}$ (1 000 ufc) le risque varie autour de 10^{-3} . D'une simulation à une autre ce risque varie plus lorsque b est de 0,1 (segment bleu avec le symbole cercle). Pour une charge de $5 \log_{10}$ le risque avoisine 1.

Pour un niveau de protection acceptable (ALOP⁴) égal à 10^{-3} , il faudrait des plans d'échantillonnage permettant de détecter avec une probabilité suffisante (exemple 95%) tous les lots présentant une charge supérieure ou égale à 1 000 ufc de STEC (traits pointillés indiqués en figure 9).

⁴ ALOP : « Degré approprié de protection [ou niveau acceptable de risque]. Degré de protection considéré approprié par le Membre établissant une mesure pour protéger la santé et la vie des personnes et des animaux ou préserver les végétaux sur son territoire » (NF V 01-002).

• **Prévalence**

La proportion de steaks hachés contaminés dépend de la charge microbienne et du mode de répartition des STEC (b). En effet, la figure 10 montre que pour une même charge microbienne par lot, la proportion de steaks hachés contaminés peut varier considérablement en fonction du degré d'homogénéité (b). De plus, l'influence du paramètre b se trouve plus importante pour les grandes charges microbiennes susceptibles d'entraîner des risques élevés.

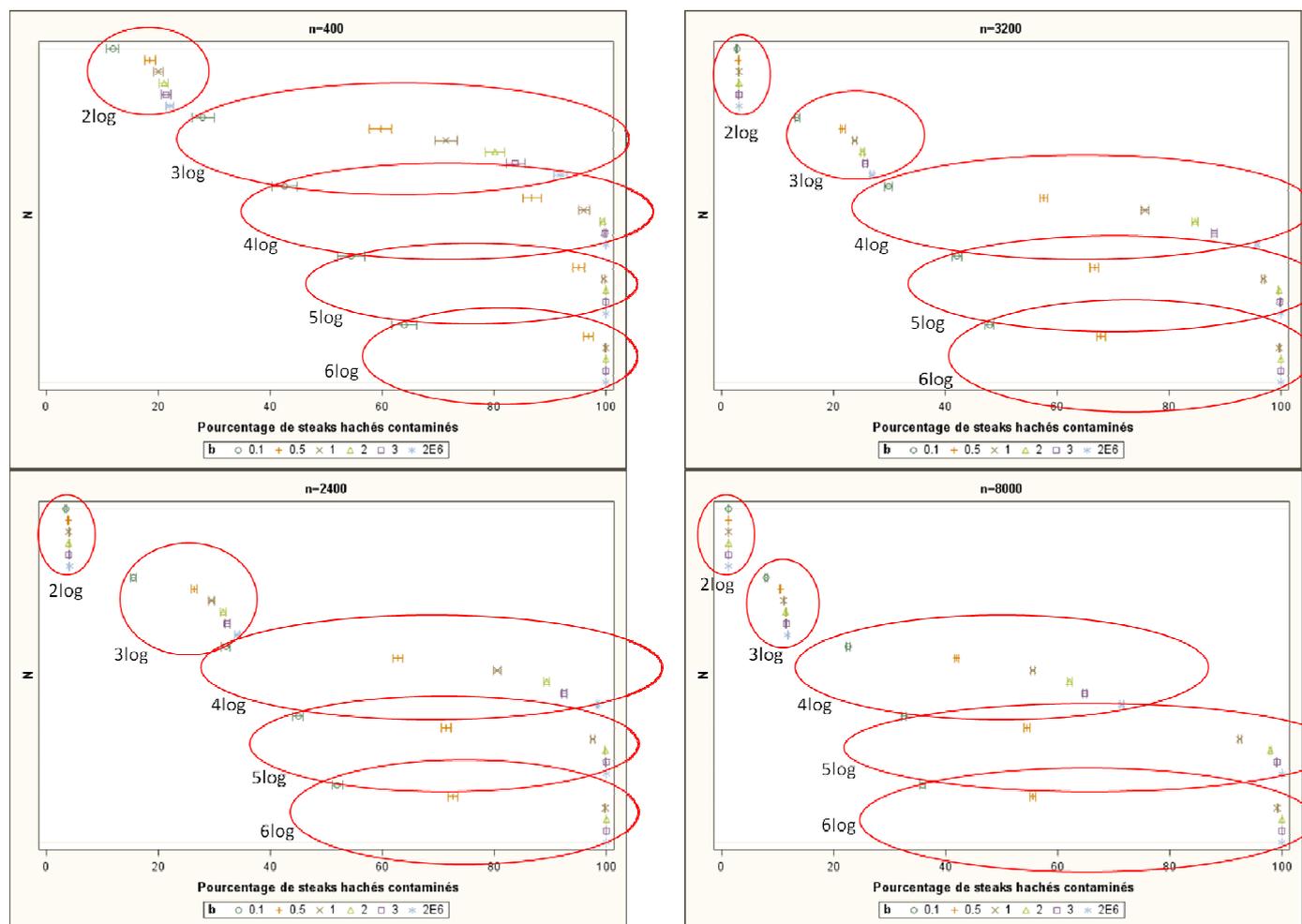


Figure 10: Pourcentage de steaks hachés contaminés par mûlée en fonction de la taille de la mûlée (n), de la charge en ufc de STEC (N) et du degré d'homogénéité (b).

Exemple de lecture : Pour le graphique où la taille n de la mûlée est de 2 400 steaks hachés, on observe que pour une charge microbienne de 4 log₁₀ (10 000 ufc) le pourcentage d'unités contaminées peut varier entre environ 30% et 100% selon le degré d'homogénéité. D'une simulation à une autre la proportion varie très peu (segments de petite taille).

Pour certaines combinaisons de b, n et N, les prévalences simulées sont plus faibles que celles indiquées dans le tableau 4. Cette différence est d'autant plus importante que la charge microbienne est élevée et que le paramètre b est faible. Les résultats de simulations présentés ci-dessus sont à privilégier à ceux obtenus par la formule approchée du tableau 4, qui n'utilise pas la contrainte suivante : la somme des ufc distribuées doit être égale à la charge microbienne totale. Par conséquent, le tableau 4 ne peut être utilisé comme approximation que pour les charges inférieures ou égales à 10 000 ufc.

4.4.8. Efficacité des plans d'échantillonnage

A partir des caractéristiques des mêlées entraînant un risque élevé pour les consommateurs, il convient de vérifier si ces lots sont détectables avec une probabilité suffisante par les plans d'échantillonnage classiques ou modifiés.

L'une des questions posées par l'administration concerne les modalités de prise de l'échantillon. Deux options se présentent :

- Un échantillon individuel : quantité de produit prise à un seul endroit de la mêlée. Un échantillon individuel doit peser au moins 25 g.
- Un échantillon composite : des échantillons individuels pris dans la même mêlée et réunis; ils sont représentatifs du lot dont ils sont issus. Un échantillon composite doit peser au moins 25g.

Les performances de deux stratégies d'échantillonnage sont évaluées grâce à un programme de simulation tenant compte d'une variation de la charge microbienne et du facteur d'homogénéité (b), selon le même principe que celui mis en œuvre dans le modèle présenté ci-dessus (Tableau 7). La figure 11 montre les résultats et le programme de simulation est présenté dans l'annexe C. En cas de contamination non homogène, pour une même masse totale prélevée, la stratégie d'un échantillon composite pris à plusieurs endroits de la mêlée a plus de chance de déceler la présence de la bactérie qu'un échantillon individuel pris à un seul endroit. La différence de sensibilité est d'autant plus importante que la répartition des ufc de STEC est hétérogène.

Il convient donc de privilégier le mode d'échantillonnage composite. Dans ce cas, le plan d'échantillon est défini par deux éléments :

- Nombre de grammes de viande hachée utilisés pour l'analyse microbiologique par prélèvement individuel ;
- Nombre de prélèvements individuels constituant l'échantillon composite.

Les combinaisons de ces deux éléments permettant d'atteindre une probabilité de détection égale à 95% selon la taille de la mêlée, le niveau d'agrégation et la contamination initiale sont présentées dans le tableau 8. Le nombre d'échantillons nécessaires pour une détection de 95% augmente quand le degré d'homogénéité diminue (Tableau 8). Le calcul suppose que la méthode analytique est parfaite, dans le sens où si une ufc est présente dans l'échantillon analysé, elle a une probabilité de 100% d'être détectée. Par exemple, pour une mêlée de 2 400 steaks et une contamination de 10 000 ufc avec une répartition homogène des ufc (b = infini), le nombre d'échantillons individuels de 5 g garantissant une probabilité de détection de 95% est de 17 soit un total de 85 g à analyser (17 x 5). Pour ces mêmes conditions, les autres combinaisons (8 x 10, 4 x 20 ou 3 x 25) correspondent à peu près aux mêmes quantités à analyser. Cependant, sous l'hypothèse d'une hétérogénéité (b=0,1), le tableau 8 montre qu'il est préférable de multiplier le nombre d'échantillons individuels tout en réduisant le nombre de grammes à analyser par échantillon (le nombre d'échantillons pour 5, 10, 20 et 25 g sont respectivement de 30, 20, 14 et 13, ce qui correspond respectivement à 150, 200, 280 et 325 g à analyser).

Les différences entre les tailles d'échantillons sont remarquables entre les deux situations extrêmes (b=0,1 et b=infini). Le nombre d'échantillons permettant d'atteindre une probabilité de détection de 95% est plus important lorsque b est égal à 0,1 comparativement au cas où b est égal à l'infini. A titre d'exemple, pour une mêlée de 2 400 steaks hachés avec une charge N = 10 000 ufc, une hétérogénéité avec un facteur b=0,1 nécessite plus de 4 fois plus (13/3) d'échantillons de 25 g que si la distribution est complètement homogène (b=infini).

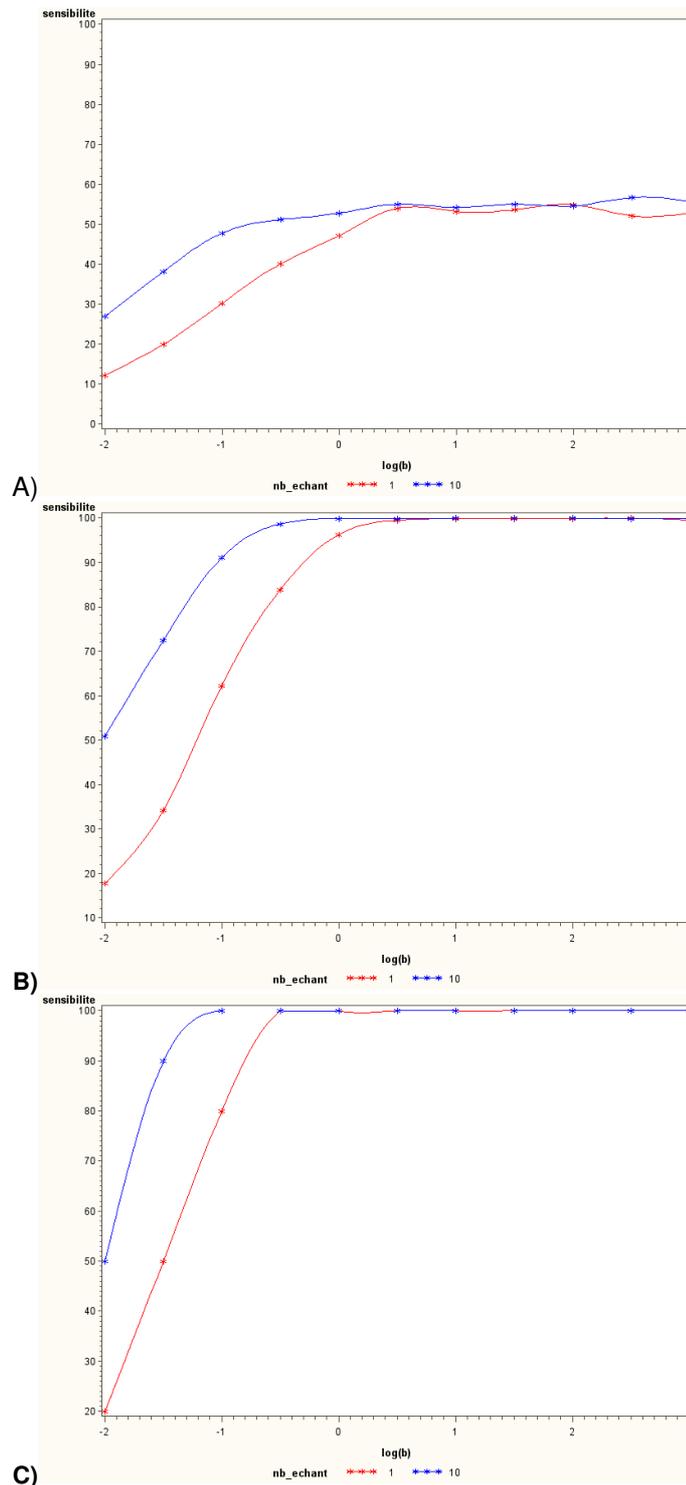


Figure 11: Sensibilité des deux modes d'échantillonnage (1 : un échantillon individuel de masse m pris en un seul endroit ; 10 : 1 échantillon composite de 10 prélèvements individuels de masses $m/10$). Les figures 11-A, 11-B et 11-C correspondent respectivement à une charge totale de 100, 1 000 et 10 000 ufc réparties dans une mêlée de 100 unités.

Tableau 8 : Nombre d'échantillons à prélever pour analyse permettant une probabilité de détection égale à 95%, en fonction de la taille de la môle (n), de la masse en grammes de chaque échantillon individuel (m), de la charge totale en ufc de STEC de la môle (N) et du degré d'homogénéité (b).

n	m	b=0,1	b=0,5	b=1	b=2	b=3	b=infini
Charge microbienne N = 1 000 ufc de STEC							
400	5	43	32	31	30	30	29
	10	27	17	16	15	15	14
	20	18	10	8	8	7	7
	25	16	8	7	6	6	5
2 400	5	194	182	181	180	180	177
	10	104	92	91	90	90	90
	20	58	47	46	45	45	44
	25	49	38	37	36	36	35
8 000	5	613	602	600	599	599	511
	10	314	302	301	300	300	278
	20	164	152	151	150	150	151
	25	134	122	121	120	120	120
Charge microbienne N = 10 000 ufc de STEC							
400	5	12	5	4	3	3	2
	10	9	3	2	2	1	1
	20	8	2	1	1	1	1
	25	7	2	1	1	1	1
2 400	5	30	20	19	18	18	17
	10	20	11	10	9	9	8
	20	14	7	5	5	4	4
	25	13	6	4	4	4	3
8 000	5	73	62	61	60	60	60
	10	43	32	31	30	30	30
	20	27	17	16	15	15	14
	25	23	14	13	12	12	11
Charge microbienne N = 100 000 ufc de STEC							
400	5	7	2	2	1	1	1
	10	6	2	1	1	1	1
	20	5	2	1	1	1	1
	25	5	2	1	1	1	1
2 400	5	11	5	4	3	3	2
	10	9	3	3	2	2	1
	20	8	3	2	2	1	1
	25	7	3	2	1	1	1
8 000	5	17	9	8	7	7	7
	10	13	6	5	4	4	3
	20	10	4	3	3	2	2
	25	10	4	3	2	2	2

n	m	b=0,1	b=0,5	b=1	b=2	b=3	b=infini
Charge microbienne N = 1 000 000 ufc de STEC							
400	5	5	2	1	1	1	1
	10	4	1	1	1	1	1
	20	4	1	1	1	1	1
	25	4	1	1	1	1	1
2 400	5	6	2	2	1	1	1
	10	6	2	1	1	1	1
	20	5	2	1	1	1	1
	25	5	2	1	1	1	1
8 000	5	8	3	2	2	2	1
	10	7	2	2	1	1	1
	20	6	2	1	1	1	1
	25	6	2	1	1	1	1

Principe de calcul : pour chacune des combinaisons m, b, N et n, la probabilité de n'avoir aucune ufc dans les m grammes

prélevés est calculée selon la formule :
$$p_0 = \frac{\Gamma(bn')\Gamma(N + b(n'-1))}{\Gamma(b(n'-1))\Gamma(bn'+N)}$$

$$\text{avec } n' = \frac{n \times 125}{m}$$

Le nombre d'échantillons de m grammes (k) nécessaire pour atteindre une probabilité de détection égale à 95% (p_d) est

$$k = \frac{\ln(1 - p_d)}{\ln(1 - p_0)}$$

obtenu en appliquant la formule suivante :

Il est important de souligner à ce stade que le calcul du nombre d'échantillons à prélever n'a pas de solution analytique exacte. Des simulations complexes sont nécessaires pour estimer ce nombre d'échantillons. Cependant, l'effet du paramètre b sur le nombre d'échantillons à prélever peut être visualisé en première approximation pour des charges inférieures à 10 000 ufc, sans avoir recours au processus itératif, pour permettre d'apporter des éléments de réponse à la question posée par l'administration.

En conséquence, les résultats présentés dans ce tableau sont à titre illustratif et ne doivent pas être considérés comme des propositions de plans d'échantillonnage.

Dans la situation rencontrée lors de l'épidémie de 2005, la contamination a été supposée homogène et la concentration moyenne au sein de la mûlée contaminée a été estimée à 5,9 ufc.g⁻¹ (Afssa 2007a). La situation la plus proche présentée dans le tableau ci-dessus correspond à la situation suivante : b infini, N= 1 000 000 ufc de STEC dans une mûlée permettant de produire 8 000 steaks hachés (n). Dans ces conditions particulières et sous l'hypothèse que toutes les bactéries de STEC pathogènes présentes dans la mûlée sont viables et cultivables, la contamination de la mûlée est alors détectable avec une probabilité égale ou supérieure à 0,95 à partir de l'analyse d'un unique prélèvement de 25 g.

4.4.9. Conclusion

Le modèle de simulation permet d'avancer les conclusions suivantes, dans la limite des hypothèses énoncées :

- Le risque d'observer deux cas de SHU ou plus chez les enfants de moins de 15 ans par mûlée augmente avec le nombre total d'ufc de STEC dans la mûlée et ce indépendamment de leur mode de dispersion (homogène ou hétérogène). D'après les résultats du modèle, les mûlées avec une charge microbienne de 1 000 ufc ou plus correspondent à des risques « d'observer deux cas de SHU ou plus chez les enfants de moins de 15 ans » supérieurs à 0,001. En d'autres termes un épisode de deux cas groupés de SHU ou plus est attendu toutes les 1 000 mûlées avec une charge microbienne de 1 000 ufc de STEC. Sous l'hypothèse d'un niveau de protection acceptable fixé par le gestionnaire à 10⁻³, il faudrait en pratique, se donner les moyens de détecter les mûlées contaminées avec une charge supérieure ou égale à 1 000 ufc de STEC, pour éviter leur mise sur le marché.

- L'efficacité des plans d'échantillonnage est très sensible non seulement à la charge totale en ufc de STEC dans la mûlée, mais aussi au degré d'homogénéité de la distribution de cette charge totale. Le nombre d'échantillons nécessaire pour une probabilité de détection égale à 95% doit être adapté pour tenir compte d'une possible hétérogénéité de la distribution des ufc.
- Le paramètre d'homogénéité (b) est inconnu. Les valeurs de b utilisées dans ce rapport sont présentées à titre illustratif. Etant donnée l'importance de ce paramètre, il est recommandé de réaliser des expérimentations permettant de l'estimer. Il n'est pas nécessaire de réaliser les expérimentations avec des bactéries pathogènes.

Les plans d'échantillonnage usuels ne permettent pas de détecter facilement, avec une taille d'échantillon raisonnable, les mûlées avec des distributions hétérogènes des ufc de STEC, bien que certaines mûlées puissent être à l'origine de cas groupés de SHU.

En conséquence, la gestion du risque de survenue de cas groupés de SHU doit principalement s'appuyer sur des actions en amont :

- contrôler et corriger les accidents d'éviscération et éviter la contamination des carcasses au moment de la dépouille ;
- identifier les carcasses souillées lors d'un accident d'éviscération pour ne pas les utiliser, après parage, pour la fabrication des steaks hachés ;
- identifier des conditions potentielles de survie des STEC pathogènes dans l'environnement des ateliers de découpes et de fabrication des steaks hachés.

4.5. Concernant l'identification du danger EPEC et de celui que pourraient représenter les souches AEEC isolées dans les aliments.

L'Anses a été saisie le lundi 11 janvier 2010 par la DGAL et la DGS d'une demande d'avis relatif à la définition et au pouvoir pathogène des souches dénommées « EPEC » dans le texte de la saisine et à l'opportunité de maintenir les mesures de gestion actuelles lors de la mise en évidence de ces souches dans les fromages au lait cru, en particulier lors d'analyses officielles.

A la lumière des précisions apportées par la DGAL et la DGS lors de leur audition par le groupe de travail « EHEC EPEC 2010 » le 23 mai 2010 et en s'appuyant sur les définitions de l'avis de l'Afssa du 27 mai 2010 (Afssa 2010), il a été demandé à l'Anses de se prononcer, non pas sur les souches EPEC *sensu stricto* isolées chez l'Homme et responsables de diarrhée sévère chez les enfants de moins de 12 mois dans les pays en voie de développement, mais sur les souches AEEC isolées dans les aliments pouvant représenter un danger potentiel quant à la survenue de SHU ou de micro-angiopathies thrombotiques (MAT) (risque associé aux souches EHEC) car elles pourraient soit correspondre à des souches STEC pathogènes ayant perdu leur gène *stx*, soit à l'inverse correspondre à des souches susceptibles d'acquérir un gène *stx* et devenir de véritables souches STEC pathogènes pour l'Homme.

L'Afssa dans son avis de mai 2010 (Afssa 2010) a conclu que lors d'un examen bactériologique d'un aliment, réalisé en dehors d'un contexte clinique chez l'Homme, seule la mise en évidence des différents facteurs ou marqueurs de virulence au sein d'une même souche STEC permet d'estimer le caractère potentiellement pathogène de cette dernière.

Après avoir rappelé les éléments de contexte de la saisine, l'objectif du présent avis est de dresser un état des lieux des connaissances actuellement disponibles sur les souches AEEC et fournir un document d'orientation pratique sur les mesures pouvant être utilisées pour la maîtrise de ce danger potentiel.

4.5.1.Éléments de contexte : Présence de souches AEEC dans les denrées alimentaires et mesures de gestion adoptées.

• Présence de souches AEEC dans les denrées alimentaires

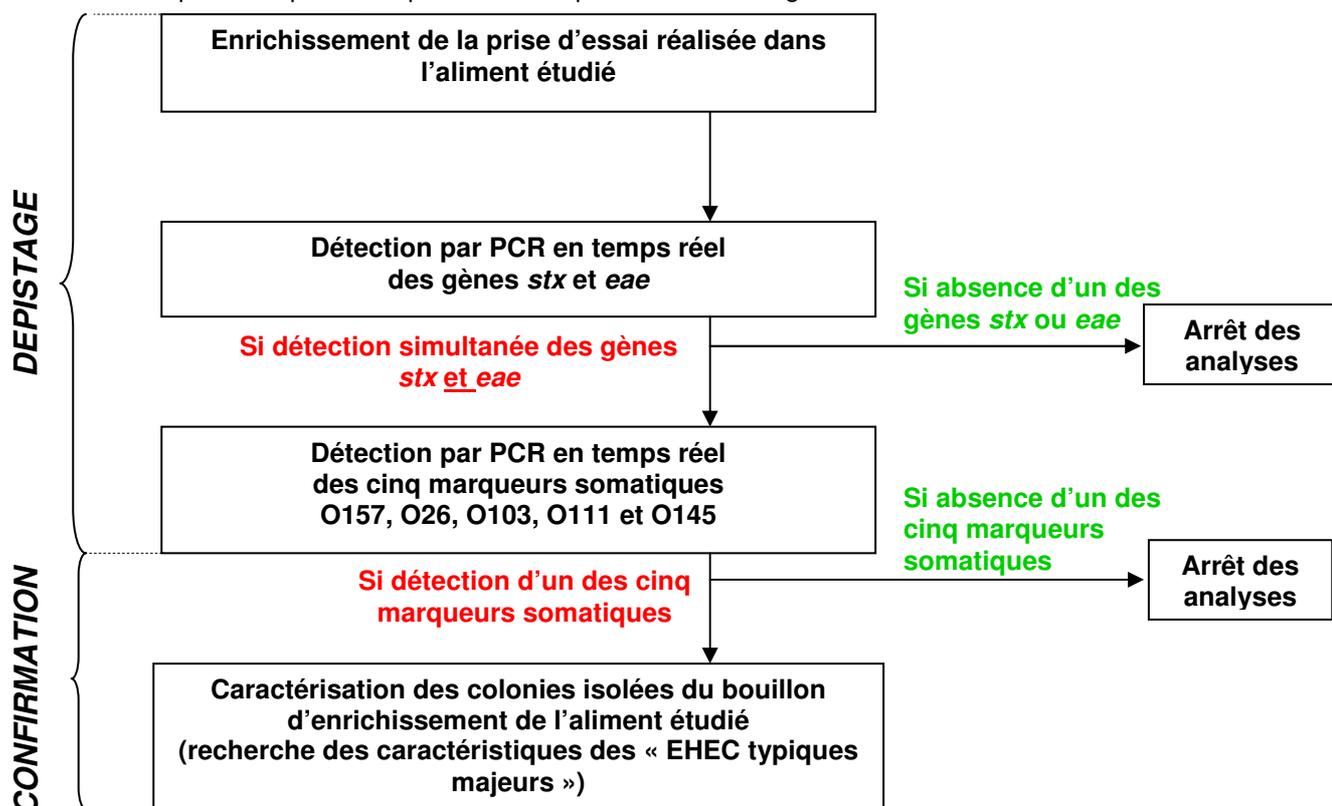
Les données relatives à la présence et à la prévalence des souches d'*E. coli eae+/stx-* (i.e. AEEC) dans les aliments mis sur le marché en France sont très parcellaires. Les seules données récentes disponibles à l'heure actuelle sont partielles et obtenues dans le cadre particulier des plans de surveillance et enquêtes de prévalence de la contamination des denrées alimentaires d'origine animale par des STEC mis en place par la DGAL, notamment en 2009 sur les fromages au lait cru et les viandes hachées réfrigérées⁵.

L'objectif de ces études est de fournir des données relatives à la présence, dans les denrées alimentaires ciblées, de STEC qui peuvent être hautement pathogènes et non de souches AEEC. Néanmoins, certaines souches AEEC ont pu être isolées au cours de ces études mais dans un contexte particulier, du fait de la méthode d'analyse mise en œuvre. En effet, la méthode choisie vise à isoler des souches STEC qui peuvent être hautement pathogènes c'est-à-dire présentant les caractéristiques des souches « EHEC typiques majeures » proposées par le projet de spécification technique en cours d'évaluation à l'ISO du CEN TC275/WG6 et recommandées par l'EFSA (EFSA 2009b). Pour mémoire, cette méthode séquentielle comprend :

- une première étape d'enrichissement de la matrice alimentaire investiguée afin de permettre aux souches pathogènes éventuellement présentes de se multiplier jusqu'à atteindre des niveaux détectables, et de façon préférentielle par rapport aux autres microorganismes présents dans ces matrices ;
- une seconde étape de détection par technique de PCR en temps réel, à partir des acides nucléiques extraits de ce bouillon d'enrichissement, des principaux marqueurs des souches STEC hautement pathogènes (gènes *stx*, gènes *eae*, et gènes associés aux 5 principaux sérogroupes d'EHEC). Cette étape de détection est séquentielle : ce n'est que si les gènes *stx* (*stx1* et/ou *stx2*) **et** *eae* sont présents simultanément que les gènes spécifiques des 5 principaux sérogroupes d'EHEC sont recherchés ;
- une troisième étape d'isolement des bactéries mise en œuvre uniquement si les résultats obtenus précédemment sont positifs c'est-à-dire si les gènes *stx* **et** *eae* **et** les gènes spécifiques des 5 principaux sérogroupes d'EHEC sont détectés de façon concomitante dans le bouillon d'enrichissement ;
- une quatrième étape de caractérisation phénotypique et génotypique des souches d'*E. coli* isolées dans l'étape précédente.

⁵ Note de service DGAL/SDSSA/N2008-8346 du 23 décembre 2008 : plan de surveillance 2009 de la contamination par *Escherichia coli* STEC/VTEC des viandes hachées réfrigérées et des fromages au lait cru au stade de la production) ; Note de service DGAL/SDSSA/N2009-8176 du 18 juin 2009 : enquête de prévalence 2009 de la contamination par *Escherichia coli* STEC/VTEC des viandes hachées réfrigérées au stade de la distribution).

L'ensemble de ces quatre étapes est repris schématiquement dans la figure 12.



PCR : *polymerase chain reaction* ; *stx* : gène codant pour les shigatoxines de type 1 et/ou 2 ; *eae* : gène codant pour l'intimine.

Figure 12: Schématisation des principales étapes de la méthode de recherche des souches STEC hautement pathogènes mise en œuvre dans le cadre du plan de surveillance de la contamination par des STEC des fromages au lait cru au stade de la production et de l'enquête de prévalence réalisée sur les viandes hachées réfrigérées au stade de la distribution mis en place par la DGAL en 2009.

Dans le cadre des études mises en place par la DGAL en 2009, sur près de 2000 échantillons de fromages au lait cru prélevés au stade de l'affinage et plus de 1500 échantillons de steaks hachés réfrigérés prélevés au stade de la distribution, analysés selon la méthode décrite ci-dessus, des souches particulières d'*E. coli stx*-négatives ont été isolées. Hormis le gène *stx*, elles possèdent les caractéristiques des souches STEC hautement pathogènes, à savoir la possession du gène *eae* (*i.e.* AEEC) et leur appartenance aux 5 sérotypes majeurs.

Ces souches AEEC particulières ont été retrouvées dans des bouillons d'enrichissement dans lesquels un gène *stx* a été détecté. Ces bouillons provenaient aussi bien de steaks hachés que de fromages au lait cru. Ces souches AEEC appartenaient principalement au sérotype O26:H11 mais également aux sérotypes O103:H2 et O145:H28.

Précédemment, ce type de souche AEEC au profil particulier a déjà été isolé en France dans des échantillons de produits carnés ou laitiers positifs pour la recherche d'un gène *stx*, que ce soit lors de plans de surveillance, d'autocontrôles (Loukiadis E., LNR *E. coli*, communication personnelle) ou d'autres études ponctuelles (Auvray F., Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort de l'ANSES, communication personnelle).

• **Mesures de gestion mises en œuvre par l'autorité compétente**

Dans le cadre du plan de surveillance 2009 de la contamination par des STEC des fromages au lait cru au stade de la production, l'adoption de mesures de gestion a été prévue en cas d'isolement de souches AEEC (*i.e.* *stx* négatives) présentant toutes les autres caractéristiques des STEC pouvant être hautement pathogènes, à partir d'aliments chez lesquels la présence de gènes *stx* a été préalablement mise en évidence.

Ainsi, en cas d'isolement d'une souche d'AEEC :

- le lot positif des fromages a été soit détruit, soit orienté vers un traitement thermique assainissant ;
- des prélèvements officiels complémentaires ont été mis en place sur le lot contaminé et/ou les lots proches de ce lot et les mesures de gestion décrites précédemment ont été mises en place sur ces lots dès lors qu'une souche AEEC a été isolée.

Aussi, afin d'évaluer le danger potentiel que représentent ces souches particulières d'AEEC et les mesures de gestion mises en place en 2009, il apparaît nécessaire de dresser un état des lieux des connaissances actuellement disponibles sur les souches AEEC pouvant être des souches STEC pathogènes ayant perdu leur gène *stx* ou des souches susceptibles d'acquérir un gène *stx*.

4.5.2. Bilan des connaissances scientifiques disponibles - Liens possibles entre souches AEEC et souches EHEC typiques: les gènes *stx* sont portés par des bactériophages mobiles.

Le danger que représentent les souches d'*E. coli* entérohémorragiques (EHEC) a été largement documenté dans les avis Afssa précédemment publiés (Afssa 2008a; Afssa 2010) et est repris brièvement ci-après.

Depuis leur première identification en 1982 (Riley, Remis *et al.* 1983; Wells, Davis *et al.* 1983), les épidémies et les cas sporadiques de colites hémorragiques, de syndromes hémolytiques et urémiques chez l'enfant ou de micro-angiopathies thrombotiques chez l'adulte, provoqués par les EHEC, sont devenus une préoccupation de santé publique importante dans plusieurs régions du monde.

La compréhension des mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène des souches EHEC est indispensable à l'évaluation du risque pour la santé publique lié à la présence de ces bactéries pathogènes, en particulier dans les denrées alimentaires. Les différents facteurs de virulence connus à ce jour ont été décrits dans l'avis Afssa du 27 mai 2010 et il convient de souligner que leur support génétique joue un rôle majeur dans l'évolution des EHEC et l'émergence de nouveaux clones pathogènes pour l'homme. Il a d'ailleurs été démontré que l'émergence des souches EHEC résulterait de l'acquisition par une souche d'*E. coli* ancestrale commensale, dans un premier temps du locus d'effacement des entérocytes (LEE), puis dans un second temps des gènes *stx* (Kelly, Vespermann *et al.* 2009; Reid, Small *et al.* 2002).

Les gènes codant les toxines Stx sont généralement portés par des bactériophages (ou phages) tempérés de type lambda dont le génome est intégré dans le chromosome des souches STEC qualifiées ainsi de bactéries lysogènes. Les différents phages portant les gènes codant les toxines Stx (ou « phages *stx* ») identifiés à ce jour chez *E. coli* et *S. dysenteriae* type 1, mais aussi plus occasionnellement chez *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *S. flexneri* et *S. sonnei*, sont tous constitués d'une molécule d'ADN double brin et appartiennent aux familles phagiques des *Siphoviridae* ou des *Myoviridae* (Beutin, Strauch *et al.* 1999; Paton and Paton 1996; Schmidt, Montag *et al.* 1993; Schmidt, Zhang *et al.* 2001).

Les bactériophages jouent un rôle primordial dans l'émergence des souches EHEC et dans leur diversité génétique : plus de la moitié des séquences spécifiques aux génomes des souches EHEC O157 sont ainsi portées par des prophages ou éléments prophagiques (Hayashi, Makino *et al.* 2001; Ohnishi, Kurokawa *et al.* 2001). Ces prophages (24 au total) sont insérés dans différents sites du chromosome et présentent une grande diversité structurelle. Le nombre, le site d'insertion et la structure des prophages portés par une souche expliquent ainsi en partie la grande diversité génétique observée chez les souches EHEC O157 (Ohnishi, Kurokawa *et al.* 2001). Ces prophages codent non seulement la toxine Stx, principal facteur de virulence des EHEC, mais également d'autres facteurs tels que les effecteurs de type III impliqués dans la formation des lésions d'attachement et d'effacement. Ils joueraient donc un rôle dans le pouvoir pathogène des souches EHEC mais aussi dans la dissémination de facteurs de virulence au sein de la population d'*E. coli* et dans l'émergence de nouvelles souches EHEC.

En effet, plusieurs études ont montré que les gènes *stx* pouvaient être véhiculés par les phages et transmis au sein de la population d'*E. coli* (Herold, Karch *et al.* 2004; Muniesa, Blanco *et al.* 2004; Muniesa and Jofre 2000;

Watarai, Sato *et al.* 1998) mais également chez d'autres *Enterobacteriaceae* comme les *Citrobacter* sp. (Schmidt, Montag *et al.* 1993) ou les *Enterobacter* sp. (Paton and Paton 1996). Ces transferts horizontaux seraient ainsi à l'origine du très grand nombre observé de sérotypes de STEC (plus de 400 répertoriés). Certains facteurs exogènes tels que les rayons UV ou des antibiotiques comme la mitomycine C (Herold, Karch *et al.* 2004) peuvent déclencher un cycle lytique chez une bactérie lysogène, se traduisant par l'excision de l'ADN du phage hors du chromosome bactérien et par la production de particules phagiques pouvant alors infecter d'autres souches bactériennes. Le cycle lytique conduit ainsi, d'une part, à la perte du phage et donc du gène *stx* par la bactérie porteuse, et d'autre part, au transfert (ou « transduction ») de ce dernier vers d'autres bactéries (Schmidt, Bielaszewska *et al.* 1999), appelé « conversion lysogénique ».

L'intégration de l'ADN phagique dans le chromosome bactérien et la réaction inverse (« l'excision ») s'effectuent par recombinaison spécifique de site selon le modèle du bactériophage lambda (Campbell 1992). Dans la bactérie lysogène, le site d'insertion bactérien (*attB*) est « interrompu » par l'ADN du phage ; lors de l'excision du phage, un site intact (ou « inoccupé ») est régénéré (Shaikh and Tarr 2003).

En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible de différencier une souche d'*E. coli* n'ayant jamais acquis de phage *stx* d'une souche d'*E. coli* correspondant à un STEC ayant perdu son phage *stx* ; il n'est pas non plus possible d'identifier, parmi les souches d'*E. coli*, celles qui sont susceptibles d'en acquérir un. Des études complémentaires sur le(s) profil(s) des souches susceptibles d'être associées à la présence du danger STEC pathogène dans un aliment sont encore nécessaires.

L'induction des phages *stx* et la conversion lysogénique de souches d'*E. coli* ont été démontrées *in vitro* (Karch, Meyer *et al.* 1992) (Bielaszewska, Prager *et al.* 2007; Garcia-Aljaro, Muniesa *et al.* 2009; Herold, Karch *et al.* 2004; Mellmann, Bielaszewska *et al.* 2005; Muniesa, Blanco *et al.* 2004; Muniesa and Jofre 2000; Watarai, Sato *et al.* 1998). L'inductibilité des phages est variable ; ainsi différents auteurs (Garcia-Aljaro, Muniesa *et al.* 2009; Muniesa, Blanco *et al.* 2004) ont observé que 18% et 89% de souches STEC provenant respectivement d'animaux et d'eaux usées, pouvaient produire des phages *stx* en présence de mitomycine C. Pour deux isolats cliniques d'EHEC O26:H11, la perte du gène *stx* a été constatée pour 10% à 14% des colonies obtenues sur des milieux gélosés ensemencés avec des cultures liquides de ces deux isolats (Bielaszewska, Prager *et al.* 2007). La fréquence de transduction de phages *stx* à des souches d'*E. coli* O26:H11 est comprise entre 6×10^{-6} et 10^{-7} par cellule receveuse (Bielaszewska, Prager *et al.* 2007).

L'induction des phages *stx* et la conversion lysogénique de souches d'*E. coli* ont également été démontrées *in vivo*, dans le tractus gastro-intestinal de souris (Acheson, Reidl *et al.* 1998) et de ruminants (Cornick, Helgerson *et al.* 2006). Les phages porteurs de gènes *stx* (que ce soit *stx1* ou *stx2*) peuvent non seulement être transférés *in vivo* à des souches de laboratoire *E. coli* K-12 (Acheson, Reidl *et al.* 1998) mais aussi à des souches commensales de la flore intestinale ovine (Cornick, Helgerson *et al.* 2006). Les fréquences de transduction estimées *in vivo* chez la souris et chez le mouton sont respectivement comprises entre 10^{-3} et 10^{-5} et entre 10^{-5} et 10^{-7} par cellule d'*E. coli* receveuse. Chez l'Homme, des données cliniques obtenues à partir de patients atteints de SHU suggèrent que des souches EHEC sont susceptibles de perdre leur phage *stx* au cours de l'infection (Bielaszewska, Prager *et al.* 2007; Mellmann, Bielaszewska *et al.* 2005) (cf. 4.5.3). Un nombre non négligeable (23%) de souches O157:H7 issues de multiples sources (bovine, aviaire et environnementale) s'est avéré également ne pas posséder de gènes *stx* (Wetzal and Lejeune 2007).

Bien que non formellement démontrée à l'heure actuelle, l'acquisition de phage *stx* par des souches commensales de la flore intestinale de l'homme (voire par des souches possédant déjà certains facteurs de virulence) suite à l'ingestion d'une souche STEC, paraît probable.

La transduction de gènes *stx* entre souches d'*E. coli* a également été rapportée récemment dans les aliments (lait, eau, viande hachée, salade) sous certaines conditions expérimentales (Imamovic, Jofre *et al.* 2009). La transduction dépend du type d'aliment contaminé (solide/liquide), de son pH et de sa température de conservation (pas de transduction observée à pH 3,7 et à 4°C), ainsi que de la nature des souches receveuses et des phages utilisés. De plus, une quantité minimale de souches donneuses et receveuses participant à la transduction doit être présente ; celle-ci est comprise entre 10^3 et 10^4 ufc par ml de produit dans les conditions expérimentales choisies (Imamovic, Jofre *et al.* 2009). Une telle quantité n'étant pas attendue dans des produits destinés aux consommateurs, il est peu probable que la transduction de gènes *stx* ait lieu dans les aliments. Les données de prévalence des STEC dans les aliments (Acheson, Ngo *et al.* 2000) semblent cependant indiquer qu'en cas d'erreur dans le plan de maîtrise sanitaire, ce risque ne puisse pas être écarté (Chua, Goh *et al.* 2008) et que le risque majeur dans ce cas soit associé à des échanges de gènes *stx* entre les différentes populations

de la microflore alimentaire et à l'émergence de nouveaux clones pathogènes pour l'Homme. Par ailleurs, les technologies de fabrication des aliments mettent en jeu des procédés qui certes réduisent la croissance de certaines bactéries mais peuvent également en prolonger la survie. Dans ces conditions, les populations bactériennes subissent un stress (Uyttendaele, Taverniers *et al.* 2001) qui pourrait induire la phase lytique des phages et être à l'origine d'une augmentation du nombre de particules phagiques libres (Brabban, Hite *et al.* 2005). Certains traitements utilisés lors de procédés de fabrication des aliments ou d'épuration des eaux comme la chloration (Muniesa, Lucena *et al.* 1999), les traitements thermiques (Muniesa and Jofre 2000), ou les hautes pressions (Aertsen, FASTER *et al.* 2005) n'inactivant pas les phages *stx*, ils pourraient être à l'origine d'une induction accrue de la phase lytique de certains phages *stx*, qui persisteraient ensuite dans les aliments à des concentrations relativement élevées (Aertsen, FASTER *et al.* 2005). Par ailleurs, il convient de souligner que la diversité des phages *stx* isolés chez l'homme (Gamage, Patton *et al.* 2004; O'Brien, Newland *et al.* 1984) et chez l'animal (Muniesa, Blanco *et al.* 2004) est importante et que les bactéries susceptibles d'être infectées et converties par ces phages sont également variées. De plus, l'utilisation de certaines molécules antibiotiques chez l'homme, l'animal ou durant certaines étapes analytiques des méthodes de détection (ex : phase d'enrichissement) pourrait favoriser l'induction de la phase lytique et augmenterait ainsi la fréquence du transfert horizontal de gènes *stx* au sein de la population des *E. coli*.

Ces études montrent que la perte des gènes *stx* par les souches EHEC durant l'infection est difficile à établir mais représente une hypothèse probable (Mellmann, Bielaszewska *et al.* 2005). La perte des gènes *stx* par les souches EHEC semblerait survenir plus particulièrement chez les souches non-O157 et notamment des souches de sérotype O26:H11 (et dérivés non mobiles) *in vitro* mais également *in vivo* (Bielaszewska, Kock *et al.* 2007; Bielaszewska, Prager *et al.* 2007). Une étude menée sur 58 souches EHEC O26 et 44 souches d'*E. coli* O26 *eae+*/*stx-*, isolées de patients présentant des SHU ou de la diarrhée provenant de 11 pays différents entre 1952 à 2003, montrent que ces deux populations de souches présentent des caractéristiques phénotypiques et génotypiques très proches (Bielaszewska, Prager *et al.* 2007). De même, l'acquisition des gènes *stx* par des souches d'*E. coli* O26 possédant le gène *eae* mais ne possédant pas le gène *stx* c'est-à-dire leur conversion en souches présentant les caractéristiques des EHEC O26 typiques a également été démontré *in vitro* (Bielaszewska, Prager *et al.* 2007).

Une autre hypothèse serait que certains patients atteints de SHU aient été infectés concomitamment par une population mixte de souches EHEC et de souches d'*E. coli eae+*/*stx-* (i.e. AEEC) présentant des caractéristiques similaires provenant de la même source, et que les souches EHEC se soient développées préférentiellement par rapport aux souches AEEC pendant la phase aiguë de l'infection (à l'origine des symptômes de SHU et de diarrhées sanglantes) mais n'aient pas persisté ensuite aussi longtemps que les souches AEEC retrouvées par la suite (Mellmann, Bielaszewska *et al.* 2005).

Une troisième hypothèse serait que la perte des gènes *stx* survienne durant l'isolement des souches au laboratoire : cette hypothèse a d'ailleurs été documentée en particulier pour les souches EHEC non-O157, appartenant notamment au sérotype O26 (Karch, Meyer *et al.* 1992), mais également chez des souches EHEC O157 (Feng, Dey *et al.* 2001).

Ainsi, durant l'infection, le transfert des gènes *stx* entre les populations de souches EHEC et d'*E. coli* possédant le gène *eae* mais ne possédant pas le gène *stx* (i.e. AEEC) pourrait être un phénomène dynamique et relativement fréquent (avec perte et gain des phages codant pour les shigatoxines) et soulève de véritables défis en termes de clinique, de diagnostic et d'épidémiologie.

Concernant les aliments, aucune donnée n'est disponible sur les mécanismes de perte de gènes *stx* par des souches STEC ou le transfert de gènes *stx* entre les populations de la microflore présente dans les aliments pouvant conduire à l'émergence de nouveaux clones de STEC pathogènes à partir de populations AEEC présentes.

Les premiers travaux ont été publiés en 2009 (Imamovic, Jofre *et al.* 2009) et ont montré que sous certaines conditions expérimentales la transduction de gènes *stx* entre souches d'*E. coli* était possible dans les aliments (lait, eau, viande hachée, salade). En l'état actuel des connaissances, l'ensemble des produits identifiés comme représentant un risque pour la santé publique au regard du danger EHEC (Considérant 14 du Règlement (CE) n°2073/2005 modifié) peuvent être concernés par cette problématique. Les données épidémiologiques disponibles montrent néanmoins que des souches AEEC et notamment des souches AEEC O26:H11 ont surtout été retrouvées dans les fromages fabriqués à partir de lait cru. Des travaux en cours suggèrent qu'une

acidification rapide aboutissant à un pH bas en fin de caillage serait un facteur limitant et/ou inhibant la croissance des souches STEC dans les produits fromagers. Cependant, ces résultats doivent encore être confirmés (Montet, Jamet *et al.* 2009) (Jamet E., communication personnelle). A l'heure actuelle, les données disponibles sont encore insuffisantes pour établir un véritable profil de risque microbiologique associé à la présence de STEC ou d'AEEC dans les fromages au lait cru tel que proposé par le *Codex alimentarius*. Plusieurs études et programmes de recherche sont d'ores et déjà en cours ou en préparation en collaboration avec les organisations professionnelles de la filière lait. Ces études portent notamment sur l'optimisation des méthodes analytiques de détection, sur le comportement et la survie des STEC considérés comme pouvant être hautement pathogènes (étude du comportement des différents sérotypes) en fonction des différentes technologies fromagères, sur la définition précise du pouvoir pathogène des souches isolées dans les fromages au lait cru français et l'impact éventuel de ces matrices ou des procédés de fabrication sur l'expression des facteurs des gènes de virulence (*stx*₁, *stx*₂, *eae*) et sur la recherche des moyens de prévention de la contamination du lait cru à la production.

Les bactériophages portant les gènes *stx* joueraient un rôle primordial dans l'émergence des souches STEC pathogènes en particulier à partir des populations d'*E. coli* possédant le gène *eae* (i.e. AEEC). Toutefois, des études complémentaires sur le(s) profil(s) des souches susceptibles d'être associées à la présence du danger STEC pathogène dans un aliment sont encore nécessaires. En effet, en l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible de différencier une souche AEEC correspondant à un *E. coli* n'ayant jamais acquis de phage *stx* d'une souche AEEC correspondant à un STEC ayant perdu un phage *stx* ; il n'est pas non plus possible d'identifier, parmi les souches d'AEEC, celles qui sont susceptibles d'acquérir un phage *stx*. Aucune donnée n'est disponible sur les mécanismes de perte des gènes *stx* par des souches STEC ou de transfert des gènes *stx* entre les populations de la microflore présente dans les aliments ; il est donc nécessaire de mettre en place des travaux pour étudier ces phénomènes. D'autre part, la prévalence des phages *stx* dans les aliments, en particulier d'origine bovine, doit être étudiée afin d'évaluer le risque d'émergence de nouvelles souches STEC pathogènes dans les aliments.

4.5.3. Données épidémiologiques disponibles: patients présentant des symptômes caractéristiques d'infection à EHEC (épidémies et cas sporadiques) chez lesquels seule une souche AEEC a pu être isolée.

• Cas recensés en Europe

La présence et la prévalence des souches d'*E. coli* possédant le gène *eae* mais ne possédant pas le gène *stx* (*E. coli eae+/stx-*) chez des patients atteints de SHU ou de colite hémorragique sont peu documentées car les stratégies utilisées en médecine humaine lors d'infection à EHEC visent à isoler dans les selles des patients des souches possédant un gène *stx*. Cependant, quelques études d'envergure ont été menées.

Notamment, une étude menée sur 10 ans (1996 et 2006) chez 787 patients atteints de SHU (Bielaszewska, Kock *et al.* 2007). Cette étude montre que, chez 5,5% des patients atteints de SHU, les seules bactéries isolées sont des souches d'*E. coli* possédant le gène *eae* mais ne possédant pas le gène *stx*. La majorité (90,7%) des souches d'*E. coli eae+/stx-* isolées appartiennent aux sérotypes O26:H11, O103:H2, O145:H28, O157:H7 et leurs dérivés non mobiles, sérotypes les plus fréquemment associés aux souches EHEC (Afssa 2010). De plus, ces souches d'*E. coli eae+/stx-* présentent le même profil génétique (profil de virulence et profil MLST, pour multilocus sequence typing, des gènes de ménage) que les souches EHEC du même sérotype, ce qui démontre leur proximité avec les EHEC typiques majeurs.

Une autre étude menée sur 12 ans (1995-2007) par la même équipe chez 10 668 patients atteints de diarrhée (cas non reliés épidémiologiquement, 118 cas de diarrhée sanglante et 10 550 cas de diarrhée non sanglante) (Bielaszewska, Middendorf *et al.* 2008) montre que les souches d'*E. coli* possédant le gène *eae* mais ne possédant pas le gène *stx* sont les seules bactéries isolées chez 15,3% des patients présentant une diarrhée sanglante et chez 1,3% des patients présentant une diarrhée non sanglante ($p < 0,001$). La très grande majorité (94,4%) de ces souches isolées des patients atteints de diarrhée sanglante présentent des caractéristiques phénotypiques (sérotypage) et génétiques (facteurs de virulence et gènes de ménage) très proches de celles des souches EHEC. Au contraire, la grande majorité (75,9%) des souches isolées des patients atteints de diarrhée non sanglante présentent des caractéristiques phénotypiques (sérotypes) et génétiques différentes de celles des souches EHEC.

D'après les auteurs de ces études, le fait que le locus chromosomique d'insertion des phages *stx* classiques chez les souches EHEC O157:H7 et O26:H11 et leurs dérivés non mobiles soit inoccupé chez ces souches d'*E. coli eae+/stx-*, i.e. AEEC, suggère que l'absence du gène *stx* est liée à l'excision des prophages du chromosome de ces bactéries durant l'infection ou durant leur isolement.

• Cas recensés en France

L'épidémie d'EHEC O26:H11-O80:H2 d'origine alimentaire survenue en 2005

Une épidémie d'EHEC O26:H11-O80:H2 est survenue dans le nord-ouest de la France entre octobre et décembre 2005 (InVS 2007). L'épidémie a été détectée à la suite d'un signalement d'excès de cas de SHU par un clinicien participant à la surveillance de SHU pédiatrique. Seize cas de SHU (12 filles et 4 garçons) âgés de 8 mois à 6 ans ont été identifiés. Ces enfants avaient présenté un SHU survenu entre le 14 octobre et 30 décembre 2005.

L'enquête alimentaire des enfants a mis en évidence une fréquence élevée de consommation de camembert parmi les cas, dont une marque particulière au lait cru. Aucune autre exposition à risque commune n'avait été mise en évidence.

Pour 14 des 16 enfants, un prélèvement de selles a été effectué. Des souches d'EHEC ont été isolées chez chacun des 14 enfants, dont 2 souches chez 2 enfants. Parmi les 16 souches identifiées, 7 étaient des *E. coli* O26:H11 : 4 possédaient les gènes *stx2* et *eae* et étaient donc de véritables EHEC, et 3 possédaient uniquement le gène *eae* et n'étaient donc que des AEEC. L'analyse moléculaire de ces 7 souches O26:H11 isolées chez les patients atteints de SHU a montré qu'elles étaient toutes génétiquement reliées, quel que soit leur profil de virulence. Les 9 autres souches, qui ont été identifiées par typage moléculaire, correspondaient à 6 souches d'EHEC O80:H2 *stx2 eae*, 2 souches d'EHEC NST *stx2 eae* et 1 souche d'EHEC O2:H5 *stx2 eae*. Pour deux enfants, une infection mixte à *E. coli* O26-O80 a été mise en évidence : EHEC O80:H2 *stx2 eae*/O26:H11 *stx-eae* pour un enfant et EHEC O80:H2 *stx2 eae*/O26:H11 *stx2 eae* pour l'autre.

L'enquête vétérinaire a permis de mettre en évidence des souches de STEC O26:H11 avec 3 profils de virulence différents dans :

- du camembert au lait cru, récupéré auprès des familles de patients (*stx- eae*) ;
- l'échantillonnage de la fromagerie impliquée (*stx2 eae* et *stx- eae*) ;
- du lait cru de mélange des fournisseurs de la fromagerie (*stx- eae* et *stx- eae-*) ;
- de l'eau d'abreuvoir dans l'élevage d'un fournisseur dont le lait a été retrouvé positif (*stx- eae*).

L'analyse moléculaire des souches d'*E. coli* O26:H11 d'origine humaine, alimentaire et environnementale associées à cette épidémie a montré qu'elles étaient toutes génétiquement reliées, quel que soit leur profil de virulence.

Les résultats des investigations ont mis en évidence l'existence d'une épidémie à *E. coli* O26:H11 et O80:H2 liée à la consommation de camembert au lait cru. Cette investigation a soulevé la difficulté d'interprétation des résultats de la recherche de STEC O26:H11 à la fois chez les patients et dans les aliments. En effet, les souches d'*E. coli* O26:H11 identifiées lors de cette épidémie ont présenté une diversité génétique, au moins du fait de l'absence ou de la présence du gène *stx* chez certaines des souches isolées tant chez les patients que dans les aliments.

La seule méthode de détection des souches STEC hautement pathogènes dans les aliments, disponible et harmonisée, est celle proposée par le projet de spécification technique en cours d'évaluation à l'ISO du CEN TC275/WG6 et recommandée par l'EFSA (EFSA 2009b). La mise en œuvre de cette méthode lors d'analyses officielles a conduit à l'isolement de souches particulières d'AEEC. En effet, isolées à partir d'un bouillon d'enrichissement d'un aliment dans lequel un gène *stx* a été détecté par PCR, ces souches présentent toutes les caractéristiques des souches STEC hautement pathogènes hormis la présence de gène *stx*.

Elles ne sont pas représentatives de l'ensemble des souches AEEC présentes dans les aliments. Elles correspondent à des souches qui, en l'état actuel des connaissances, pourraient être le témoin de la présence de STEC pouvant être hautement pathogènes dans l'aliment, dont elles dériveraient après la perte du gène *stx*, soit dans l'aliment, soit durant leur isolement, mais aucune technique ne permet aujourd'hui de l'infirmier ou de le confirmer.

Dans ce cas précis d'isolement au laboratoire d'une souche AEEC appartenant à un des 5 sérotypes d'EHEC typiques majeurs dans un bouillon d'enrichissement dans lequel un gène *stx* a été détecté, il n'est donc pas possible de conclure à l'heure actuelle quant à l'absence ou la présence d'un STEC pouvant être hautement pathogène dans l'aliment.

L'acquisition de connaissances scientifiques supplémentaires concernant les mécanismes d'acquisition et de perte des gènes *stx* chez *E. coli* et la caractérisation génétique et phénotypique des souches AEEC est indispensable pour pouvoir caractériser le risque associé à l'isolement de ces souches dans l'aliment avant de décider de la mise en place de mesures de gestion adaptées.

5. CONCLUSION

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail conclut :

1- Concernant les critères microbiologiques utilisables pour s'assurer de l'efficacité d'un plan de maîtrise sanitaire vis-à-vis du danger STEC pathogène :

- il n'existe actuellement pas de meilleur indicateur d'hygiène des procédés pour suivre la contamination fécale d'un aliment que celui concernant *E. coli* (possédant une bêta-glucuronidase et croissant à 44°C), tel que défini dans le Règlement (CE) N°2073/2005 modifié ;

- il n'est toujours pas pertinent de définir un critère de sécurité spécifique des STEC pathogènes. Cependant, ces bactéries pathogènes doivent être recherchées dans le cadre de la réalisation des autocontrôles et du respect des principes généraux fixés par le « Paquet hygiène ». En effet, il est important de souligner à ce stade que la mise en place d'analyses microbiologiques est de nature à réduire le risque de survenue de cas groupés de syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans. Toutefois, la réduction du risque associée à cette mesure n'est pas quantifiable en l'état actuel des connaissances.

2- Concernant la nécessité de mettre en place des études pour l'acquisition de données permettant de compléter l'analyse quantitative du risque de SHU ou d'infection à EHEC associés à la consommation de steak haché de bœuf, les recommandations sont les suivantes :

- étendre les études sur le portage digestif et cutané chez les bovins à d'autres STEC pathogènes que ceux du sérotype O157, et en particulier ceux des mêmes sérotypes que les EHEC typiques majeurs ;

- mieux évaluer, à l'abattoir, le transfert de STEC pathogènes du pelage ou du tube digestif vers la carcasse et entre carcasses, et l'efficacité des mesures de maîtrise et des actions correctrices en cas d'accident d'éviscération ;

- mieux caractériser les phénomènes de répartition de la contamination entre les différentes pièces de viande utilisées pour le hachage ;

- collecter et analyser plus de données pour une meilleure connaissance au stade de la consommation des pratiques de conservation, de préparation et de consommation de steak haché de bœuf, pour les enfants de moins de 15 ans ;

- réaliser une investigation poussée des épidémies d'infections à EHEC avec une source de contamination alimentaire confirmée, comprenant notamment l'identification du maximum possible de personnes présentant une forme non-sévère de l'infection et la détermination de la charge microbienne contaminant les aliments incriminés.

3- Concernant la détermination des concentrations de STEC pathogènes dans la viande hachée de bovins au-dessus desquelles plusieurs cas de SHU peuvent être observés, le modèle de simulation utilisé permet d'avancer les conclusions et recommandations suivantes :

- L'efficacité des plans d'échantillonnage est très sensible non seulement à la charge totale en ufc de STEC dans la mêlée, mais aussi au degré d'homogénéité de la distribution de cette charge totale ;
- Les plans d'échantillonnage usuels avec une taille d'échantillon raisonnable peuvent permettre de détecter les mêlées avec une distribution homogène des ufc de STEC pouvant être pathogènes. Cependant, ces plans ne permettent pas de détecter facilement les mêlées avec une distribution hétérogène des ufc de STEC, bien que certaines mêlées puissent être à l'origine de cas groupés de SHU ;
- En conséquence, la gestion du risque de survenue de cas groupés de SHU devrait s'appuyer sur des actions en amont :
 - contrôler et corriger les accidents d'éviscération et éviter la contamination des carcasses au moment de la dépouille ;
 - identifier les carcasses souillées lors d'un accident d'éviscération pour ne pas les utiliser, après parage, pour la fabrication des steaks hachés ;
 - identifier des conditions potentielles de survie des STEC pathogènes dans l'environnement des ateliers de découpes et de fabrication des steaks hachés.

En conclusion, le risque d'observer deux cas de SHU ou plus chez les enfants de moins de 15 ans par mêlée augmente avec le nombre total d'ufc de STEC dans la mêlée et ce indépendamment de leur mode de dispersion (homogène ou hétérogène). Par ailleurs, la probabilité de détection des lots contaminés est très sensible au degré d'hétérogénéité.

4- Concernant le pouvoir pathogène des souches AEEC :

- Dans le cas de l'isolement au laboratoire d'une souche AEEC appartenant à un des 5 sérogroupes d'EHEC typiques majeurs dans un bouillon d'enrichissement dans lequel un gène *stx* a été détecté, il n'est pas possible dans l'état actuel des connaissances, de conclure quant à l'absence ou la présence dans l'aliment d'un STEC pouvant être hautement pathogène.
- Des connaissances scientifiques supplémentaires sur les mécanismes d'acquisition et de perte des gènes *stx* chez *E. coli* et sur la caractérisation génétique et phénotypique des souches AEEC sont nécessaires pour définir le risque associé à l'isolement de ces souches dans un aliment et mettre en place des mesures de gestion adaptées.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Escherichia coli entérohémorragique (EHEC), *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), infections gastro-intestinales. Syndrome hémolytique et urémique (SHU), épidémie, *Escherichia coli* producteur de shigatoxines (STEC), « Attaching and effacing *E. coli* » (AEEC), Critères microbiologiques, Appréciation quantitative de risque, Aliments.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acheson DW, Ngo T, Chitrakar (2000) Prevalence of O157 and non-O157 STEC in the United States. In '4th international Symposium on 'Shiga Toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections'. Kyoto, Japan

Acheson DW, Reidl J, Zhang X, Keusch GT, Mekalanos JJ, Waldor MK (1998) In vivo transduction with shiga toxin 1-encoding phage. *Infect Immun* **66**, 4496-8.

Aertsen A, Faster D, Michiels CW (2005) Induction of Shiga toxin-converting prophage in Escherichia coli by high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1155-62.

Afchain AL, Cornu M, Derens E, Guilpart J (2005) Statistical modelling of cold-smoked-salmon thermal profiles for risk assessment of Listeria monocytogenes. *Acta Horticulturae* **674**, 383-388.

Afssa (2003) 'Bilan dees connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de shiga-toxines (STEC).'

Afssa (2007a) '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.'

Afssa (2007b) 'Avis du 18 janvier 2007 relatif à la demande de création de documents de référence concernant des flores microbiennes utilisables en tant qu'indicateurs d'hygiène des procédés.'

Afssa (2008a) Avis du 15 juillet 2008 relatif aux souches d'Escherichia coli productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme.

Afssa (2008b) Recommandations pour l'élaboration de critères microbiologiques d'hygiène des procédés. <http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Ra-CriteresMic.pdf>.

Afssa (2010) Avis du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008.

Andral B, Aspan A, Perelle S, Fach P (2004) PCR detection of virulence genes and molecular epidemiology of STEC O157 isolates from French abattoirs. *Vet Rec* **155**, 365-8.

Anses (2010) Contaminations microbiologiques des viandes à l'abattoir, Avis du 10 décembre 2010.

Arthur TM, Keen JE, Bosilevac JM, Brichta-Harhay DM, Kalchayanand N, Shackelford SD, Wheeler TL, Nou X, Koohmaraie M (2009) Longitudinal study of Escherichia coli O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6515-23.

Bell RG (1997) Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *J Appl Microbiol* **82**, 292-300.

Beutin L, Strauch E, Fischer I (1999) Isolation of Shigella sonnei lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin. *Lancet* **353**, 1498.

Bielaszewska M, Kock R, Friedrich AW, von Eiff C, Zimmerhackl LB, Karch H, Mellmann A (2007) Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS One* **2**, e1024.

Bielaszewska M, Middendorf B, Kock R, Friedrich AW, Fruth A, Karch H, Schmidt MA, Mellmann A (2008) Shiga toxin-negative attaching and effacing Escherichia coli: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. *Clin Infect Dis* **47**, 208-17.

Bielaszewska M, Prager R, Kock R, Mellmann A, Zhang W, Tschape H, Tarr PI, Karch H (2007) Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic Escherichia coli O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3144-50.

Boqvist S, Aspan A, Eriksson E (2009) Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in fecal and ear samples from slaughtered cattle in Sweden. *J Food Prot* **72**, 1709-12.

Brabban AD, Hite E, Callaway TR (2005) Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog Dis* **2**, 287-303.

Brooks JC, Alvarado M, Stephens TP, Kellermeier JD, Tittor AW, Miller MF, Brashears MM (2008) Spoilage and safety characteristics of ground beef packaged in traditional and modified atmosphere packages. *J Food Prot* **71**, 293-301.

Campbell AM (1992) Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *J Bacteriol* **174**, 7495-9.

Cassin MH, Paoli GM, Lammerding AM (1998) Simulation modeling for microbial risk assessment. *J Food Prot* **61**, 1560-6.

Chua D, Goh K, Saftner RA, Bhagwat AA (2008) Fresh-cut lettuce in modified atmosphere packages stored at improper temperatures supports enterohemorrhagic *E. coli* isolates to survive gastric acid challenge. *Food Microbiology and Safety* **73**, 148-153.

Cobbaut K, Berkvens D, Houf K, De Deken R, De Zutter L (2009) *Escherichia coli* O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors. *J Food Prot* **72**, 1848-53.

Cornick NA, Helgerson AF, Mai V, Ritchie JM, Acheson DW (2006) In vivo transduction of an *Stx*-encoding phage in ruminants. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5086-8.

Cummins E, Nally P, Butler F, Duffy G, O'Brien S (2008) Development and validation of a probabilistic second-order exposure assessment model for *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef trimmings from Irish meat plants. *Meat Science* **79**, 139-154.

de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, Bartelds AI, van Duynhoven YT (2001) Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* **154**, 666-74.

Delignette-Muller ML, Cornu M (2008) Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households. *Int J Food Microbiol* **128**, 158-64.

Duffy G, Cummins E, Nally P, O'Brien S, Butler F (2006) A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Science* **74**, 76-88.

EFSA (2007a) Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from Efsa on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The EFSA Journal* **579**, 1-61.

EFSA (2007b) Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. *The EFSA Journal* **599**, 1-42.

EFSA (2009a) The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the european union in 2007. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/223r.pdf>.

EFSA (2009b) Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food) on request of EFSA. *The EFSA Journal* **7**, 1366 [43pp.].

EFSA (2010) The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the european union in 2008. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf>.

Feng P, Dey M, Abe A, Takeda T (2001) Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 711-7.

Fox JT, Renter DG, Sanderson MW, Nutsch AL, Shi X, Nagaraja TG (2008) Associations between the presence and magnitude of *Escherichia coli* O157 in feces at harvest and contamination of preintervention beef carcasses. *J Food Prot* **71**, 1761-7.

Garage SD, Patton AK, Hanson JF, Weiss AA (2004) Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. *Infect Immun* **72**, 7131-9.

Garcia-Aljaro C, Muniesa M, Jofre J, Blanch AR (2009) Genotypic and phenotypic diversity among induced, *stx2*-carrying bacteriophages from environmental *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* **75**, 329-36.

Ghafir Y, China B, Dierick K, De Zutter L, Daube G (2008) Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *J Food Prot* **71**, 35-45.

Gill CO (2009) Effects on the microbiological condition of product of decontaminating treatments routinely applied to carcasses at beef packing plants. *J Food Prot* **72**, 1790-801.

Gill CO, Bryant J (1997) Assessment of the hygienic performances of two beef carcass cooling processes from product temperature history data or enumeration of bacteria on carcass surfaces. *Food Microbiology* **14**, 593-602.

Haas CN, Thayyar-Madabusi A, Rose JB, Gerba CP (2000) Development of a dose-response relationship for *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **56**, 153-9.

Havelaar AH, Brul S, de Jong A, de Jonge R, Zwietering MH, Ter Kuile BH (2010) Future challenges to microbial food safety. *Int J Food Microbiol* **139 Suppl 1**, S79-94.

Hayashi T, Makino K, et al. (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**, 11-22.

Herold S, Karch H, Schmidt H (2004) Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol* **294**, 115-21.

Hussein HS (2007) Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci* **85**, E63-72.

Imamovic L, Jofre J, Schmidt H, Serra-Moreno R, Muniesa M (2009) Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1764-8.

InVS (2006) 'Evaluation de la surveillance du syndrome hémolytique et urémique typique ou post-diarrhéique en France, 1996-2003.' Institut de veille sanitaire.

InVS (2007) 'Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembret au lait cru, Nord-Ouest de la France, Octobre-Décembre 2005 - Rapport d'investigation.' Institut de veille sanitaire.

Karch H, Meyer T, Russmann H, Heesemann J (1992) Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect Immun* **60**, 3464-7.

Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ (2009) Gene transfer events and their occurrence in selected environments. *Food Chem Toxicol* **47**, 978-83.

King LA, Mailles A, et al. (2009) Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiol Infect* **137**, 889-96.

Kosmider RD, Nally P, Simons RRL, Brouwer A, Cheung S, Snary EL, Wooldridge M (2010) Attribution of Human VTEC O157 Infection from Meat Products: A Quantitative Risk Assessment Approach. *Risk Analysis* **30**, 753-765.

- Koutsoumanis K (2009) Modeling food spoilage in microbial risk assessment. *J Food Prot* **72**, 425-7.
- Lindblad M, Lindmark H, Lambertz ST, Lindqvist R (2007) Microbiological baseline study of swine carcasses at Swedish slaughterhouses. *J Food Prot* **70**, 1790-7.
- Luber P (2009) Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs - which risks need to be managed first? *Int J Food Microbiol* **134**, 21-8.
- Mather AE, Innocent GT, et al. (2007) Risk factors for hide contamination of Scottish cattle at slaughter with *Escherichia coli* O157. *Prev Vet Med* **80**, 257-70.
- Mather AE, Reid SW, et al. (2008) Factors associated with cross-contamination of hides of Scottish cattle by *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6313-9.
- McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, Thomson-Carter FM, Garvey P, McGuire L, Blair IS, McDowell DA (2003) The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *J Appl Microbiol* **95**, 256-66.
- Mellmann A, Bielaszewska M, Zimmerhackl LB, Prager R, Harmsen D, Tschape H, Karch H (2005) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. *Clin Infect Dis* **41**, 785-92.
- Membre JM, Leporq B, Vialette M, Mettler E, Perrier L, Thuault D, Zwietering M (2005) Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *Int J Food Microbiol* **100**, 179-86.
- Montet MP, Jamet E, Ganet S, Dizin M, Miszczycha S, Duniere L, Thevenot D, Vernozy-Rozand C (2009) Growth and Survival of Acid-Resistant and Non-Acid-Resistant Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains during the Manufacture and Ripening of Camembert Cheese. *Int J Microbiol* **2009**, 653481.
- Muniesa M, Blanco JE, De Simon M, Serra-Moreno R, Blanch AR, Jofre J (2004) Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**, 2959-71.
- Muniesa M, Jofre J (2000) Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the Stx 2 gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiol Lett* **183**, 197-200.
- Muniesa M, Lucena F, Jofre J (1999) Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J Appl Microbiol* **87**, 402-9.
- Nauta M, Evers E, Takumi K, Havelaar A (2001) 'Risk assessment of shiga-like producing *Escherichia coli* O157 in steak tartar in the Netherlands.' RIVM report 257851003. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, The Netherlands.
- Nauta MJ (2005) Microbiological risk assessment models for partitioning and mixing during food handling. *Int J Food Microbiol* **100**, 311-22.
- Nauta MJ, Fischer AR, van Asselt ED, de Jong AE, Frewer LJ, de Jonge R (2008) Food safety in the domestic environment: the effect of consumer risk information on human disease risks. *Risk Anal* **28**, 179-92.
- NF V 01-002, Hygiène des aliments, Glossaire-français-anglais. Septembre 2008.
- O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**, 694-6.

O'Bryan CA, Crandall PG, Martin EM, Griffis CL, Johnson MG (2006) Heat resistance of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria innocua* M1, a potential surrogate for *Listeria monocytogenes*, in meat and poultry: A review. *Journal of Food Science* **71**, 23-30.

Ohnishi M, Kurokawa K, Hayashi T (2001) Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol* **9**, 481-5.

Ou D, Mittal GS (2006) Double-sided pan-frying of unfrozen/frozen hamburgers for microbial safety using modelling and simulation. *Food Res. Int.* **39**, 133-144.

Ou D, Mittal GS (2007) Single-sided pan frying of frozen hamburgers with flippings for microbial safety using modelling and simulation. *J. Food Engineering* **80**, 33-45.

Paton AW, Paton JC (1996) *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **34**, 463-5.

Posse B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L (2008) Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *FEMS Microbiol Lett* **282**, 124-31.

Powel MR, Ebel E, Schlosser W, Walderhaug M, Kause J (2000) Dose-response envelope for *Escherichia coli* O157:H7. *Quant. Microbiol.* **2**, 141-163.

Reid CA, Small A, Avery SM, Buncic S (2002) Presence of food-borne pathogens on cattle hides. *Food Control* **13**, 411-415.

Rhoades JR, Duffy G, Koutsoumanis K (2009) Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiol* **26**, 357-76.

Riley LW, Remis RS, et al. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**, 681-5.

Ross T, Ratkowsky DA, Mellefont LA, McMeekin TA (2003) Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **82**, 33-43.

Schmidt H, Bielaszewska M, Karch H (1999) Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3855-61.

Schmidt H, Montag M, Bockemuhl J, Heesemann J, Karch H (1993) Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun* **61**, 534-43.

Schmidt H, Zhang WL, Hemmrich U, Jelacic S, Brunder W, Tarr PI, Dobrindt U, Hacker J, Karch H (2001) Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**, 6863-73.

Shaikh N, Tarr PI (2003) *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J Bacteriol* **185**, 3596-605.

Stephens TP, McAllister TA, Stanford K (2009) Perineal swabs reveal effect of super shedders on the transmission of *Escherichia coli* O157:H7 in commercial feedlots. *J Anim Sci* **87**, 4151-60.

Strachan NJ, Doyle MP, Kasuga F, Rotariu O, Ogden ID (2005) Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *Int J Food Microbiol* **103**, 35-47.

Teunis P, Takumi K, Shinagawa K (2004) Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data. *Risk Anal* **24**, 401-7.

Uyttendaele M, Jozwik E, Tutenel A, De Zutter L, Uradzinski J, Pierard D, Debevere J (2001) Effect of acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of buffered lactic acid to decontaminate chilled beef tissue and effect of modified atmosphere packaging on survival of *Escherichia coli* O157:H7 on red meat. *J Food Prot* **64**, 1661-6.

Uyttendaele M, Taverniers I, Debevere J (2001) Effect of stress induced by suboptimal growth factors on survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **66**, 31-7.

Vaillant V, de Valk H, et al. (2005) Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog Dis* **2**, 221-32.

van Asselt E, Fischer A, de Jong AE, Nauta MJ, de Jonge R (2009) Cooking practices in the kitchen-observed versus predicted behavior. *Risk Anal* **29**, 533-40.

van Asselt ED, Zwietering MH (2006) A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int J Food Microbiol* **107**, 73-82.

Van Donkersgoed J, Graham T, Gannon V (1999) The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* in the feces and rumen of cattle at processing. *Can Vet J* **40**, 332-8.

Watarai M, Sato T, Kobayashi M, Shimizu T, Yamasaki S, Tobe T, Sasakawa C, Takeda Y (1998) Identification and characterization of a newly isolated shiga toxin 2-converting phage from shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**, 4100-7.

Weber P, Laudat P, Dye D, Epiville elr (2003) Bactéries entéropathogènes isolées des coprocultures en médecine de ville : enquête « EPICOP » 1999-2000. *BEH* **8**, 45-46.

Wells JE, Shackelford SD, et al. (2009) Prevalence and level of *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides of feedlot steers fed diets with or without wet distillers grains with solubles. *J Food Prot* **72**, 1624-33.

Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, Morris GK (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* **18**, 512-20.

Wetzel AN, Lejeune JT (2007) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce Shiga toxin from bovine, avian and environmental sources. *Lett Appl Microbiol* **45**, 504-7.

Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, Wall PG, Rodrigues LC, Tompkins DS, Hudson MJ, Roderick PJ (1999) Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *The Infectious Intestinal Disease Study Executive. Bmj* **318**, 1046-50.

ANNEXE A – RAPPELS CONCERNANT LE REGLEMENT (CE) N°2073/2005 DE LA COMMISSION DU 15 NOVEMBRE 2005 CONCERNANT LES CRITERES MICROBIOLOGIQUES APPLICABLES AUX DENREES ALIMENTAIRES, MODIFIE.

• **Rappel du considérant n°14 :**

« Le CSMVSP a délivré, les 21 et 22 janvier 2003, un avis sur *E. coli* vérotoxino-gène (VTEC) dans les denrées alimentaires. Dans cet avis, le comité est parvenu à la conclusion que l'application d'une norme microbiologique pour VTEC O157 dans le produit final n'entraînerait probablement pas de réductions sensibles du risque connexe pour les consommateurs. Néanmoins, des orientations microbiologiques destinées à réduire la contamination fécale dans la chaîne alimentaire peuvent contribuer à réduire les risques pour la santé publique, y compris ceux liés à VTEC.

Le comité a identifié les catégories de denrées alimentaires dans lesquelles VTEC présente un risque pour la santé publique. Il s'agit des viandes crues ou peu cuites de bœuf et éventuellement d'autres ruminants, des viandes hachées, de la viande de bœuf fermentée et des produits à base de viande de bœuf fermentée, du lait cru et des produits au lait cru, des produits frais, notamment les graines germées et les jus de fruits et de légumes non pasteurisés. »

• **Rappel des critères d'hygiène des procédés figurant dans le Règlement (CE) N°2073/2005 modifié, concernant la filière « viandes et produits à base de viandes » bovines.**

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage		Limites		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.1.1 Carcasses de bovins, [...]	Nombre de colonies aérobies			3,5 log ufc/cm ² *	5 log ufc/cm ² *	ISO 4833	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
	<i>Enterobacteriaceae</i>			1,5 log ufc/cm ² *	2,5 log ufc/cm ² *	ISO 21528-2	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
2.1.3 Carcasses de bovins, [...]	<i>Salmonella</i>	50	2	Absence dans la partie examinée de la carcasse		EN/ ISO 6579	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Amélioration de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
2.1.6 Viande hachée	Nombre de colonies aérobies	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières
	<i>E. coli</i> **	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières
2.1.7 Viandes séparées mécaniquement (VSM)	Nombre de colonies aérobies	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières
	<i>E. coli</i> **	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage		Limites		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.1.8 Préparations de viande	E. coli **	5	2	500 ufc/g ou cm ²	5 000 ufc/g ou cm ²	ISO 16649-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et améliorations de la sélection et/ou de l'origine des matières premières

* : log moyen quotidien. ** « E. coli est utilisé ici comme indicateur de contamination fécale. » (cf. note N°8, page 23, du Règlement (CE) N°2073/2005 modifié)

ANNEXE B – PRESENTATION DES SOURCES D'INFORMATION CONCERNANT LA PREPARATION ET LA CONSOMMATION DE STEAKS HACHES EN FRANCE.

1. Présentation des précédentes enquêtes de consommation menées

- Enquêtes INCA 99⁶ et INCA 2⁷ :

Deux enquêtes « individuelles et nationales de consommation alimentaires » (INCA) ont été menées successivement en 1999 pour l'enquête INCA 99 et entre décembre 2005 et mai 2007 pour l'enquête INCA 2. Ces deux enquêtes ont recueilli les consommations alimentaires d'adultes et d'enfants de plus de 3 ans représentatifs de la population française en utilisant une méthodologie identique (carnet de consommation sur 7 jours consécutifs). Les quantités consommées sont estimées à l'aide d'unités de mesures usuelles (cuillères à café, à soupe, par exemple) ou de photos représentant, pour certaines catégories d'aliments, différentes tailles de portion.

En outre, les données de consommation ont été complétées par un auto-questionnaire, qui a inclu des questions sur les pratiques culinaires et de consommation, rempli par l'enquêté adulte. Les questions portant sur le niveau de cuisson des viandes et sur la consommation de viande crue sont détaillées plus loin.

Néanmoins, ces enquêtes n'apportent aucune information sur les consommations des enfants de moins de 3 ans.

- Enquête Bébés TNS-SOFRES SFAE 2005 :

Une étude a été réalisée en 2005 par TNS-SOFRES⁸ et le CHU de Dijon pour le compte du syndicat français des aliments de l'enfance (SFAE). Elle a recueilli les consommations de 713 enfants de 15 jours à 36 mois en utilisant la méthode du carnet alimentaire sur trois jours consécutifs. Ont été distingués, dans cette enquête, les aliments infantiles (lains infantiles, farines, potages, purées, « petits pots ») et les aliments « courants » qui sont les aliments n'appartenant pas aux aliments spécifiques pour bébés (=aliments infantiles).

Ont été exclus de cette étude les enfants nourris au sein (partiellement ou exclusivement) ou fréquentant une crèche collective ou une école dans les trois jours précédent l'enquête, en raison de difficultés possibles d'apprécier les quantités réellement consommées par l'enfant.

- Enquête sur les habitudes de cuisson des steaks hachés consommés par les enfants de moins de 16 ans, groupe de travail AQR STEC⁹ :

⁶ Volatier JL (2000). Enquête INCA individuelle et nationale sur les consommations alimentaires. Tec & Doc Lavoisier, Paris 158p.

⁷ Afssa (2009). Etude individuelle nationale des consommations alimentaires 2 (INCA 2). 225 p.

⁸ SFAE. (2008). Données de contamination des aliments infantiles fournies par les adhérents du SFAE. Décembre 2008.

⁹ Rapport de l'Afssa sur l'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). 139p. www.anses.fr

Contrairement aux études précédentes qui sont des études représentatives de la population française, il s'agit d'une enquête ad-hoc réalisée par les membres du groupe de travail afin de recueillir des données manquantes sur les niveaux de cuisson des steaks consommés par les enfants de moins de 16 ans, nécessaires à la réalisation du travail d'appréciation quantitative des risques liés à *Escherichia coli* O157 : H7 dans les steaks hachés surgelés consommés en France. Cette enquête a porté sur 589 enfants de moins de 16 ans.

Cette enquête ad-hoc n'est pas représentative de la population française et ne porte pas sur les enfants de 16 à 18 ans.

2. Modes de conservation (et températures de conservation)

Dans l'enquête INCA 2, il est possible de distinguer la consommation de steak haché frais et celle des steaks hachés surgelés¹⁰, quand cette distinction est connue de la personne enquêtée : cela concerne donc essentiellement la consommation à domicile.

La température moyenne des réfrigérateurs est renseignée, dans le cadre de cette enquête, de manière déclarative, par les ménages dont le réfrigérateur dispose d'un thermomètre. Par contre, à défaut, d'une part, de la description de l'emplacement de la prise de température les températures de conservation des steaks hachés, d'autre part, de l'emplacement des steaks hachés dans le réfrigérateur, il n'est pas possible d'en déduire la température de conservation des steaks hachés.

Ces températures déclaratives moyennes pourraient avantageusement être remplacées par des températures mesurées dans les réfrigérateurs ménagers, si elles existent. On peut citer, par exemple, les relevés de température obtenus dans le cadre des études Cemagef/Afssa/Ania (Afchain, Cornu *et al.* 2005), citées dans le rapport Afssa « *Construction d'une démarche interdisciplinaire de description du processus sanitaire modulant l'exposition au danger L. monocytogenes dans les produits réfrigérés* » (novembre 2006). D'autres sources de données peuvent également être utilisées (EFSA 2007b).

Les températures des congélateurs ménagers ne sont pas renseignées dans cette étude.

3. Modes de préparation

Dans l'enquête INCA 2, le mode de cuisson des viandes devait être précisé dans le carnet recueil de consommation, pour chacune des occasions de consommation. Différentes modalités de cuisson étaient proposées dans le manuel d'utilisation du carnet de consommation (page 3 sur 14).

Tableau 2 : Modes de cuisson devant être renseignés pour les viandes consommées lors de l'enquête INCA 2

Modalité de cuisson	description
Poêlée	Cuite à la poêle
grillée	Grillée sur une plaque, un barbecue...
rôtie	Cuite au four
braisée ou sautée	Revenue dans une matière grasse puis cuite dans une cocotte avec un fond liquide
bouillie	Cuite dans une grande quantité de liquide – viande immergée - contenant des aromates

Dans la pratique, cette information a été très peu renseignée dans les carnets de consommation (moins de 10% des occasions de consommation de steaks hachés), ce qui la rend inexploitable. De plus, il n'y a aucune information disponible sur la décongélation préalable ou non des steaks hachés avant cuisson, alors que cela peut avoir une influence notable sur les échanges thermiques lors de la cuisson.

¹⁰ La présentation de l'aliment avant cuisson est renseignée en fonction de quatre modalités (« frais », « conserve », « surgelé », « autre ») dans le carnet de consommation. Cette information doit, en principe, être complétée pour chacun des aliments consommés.

4. Fréquence de consommation et quantités consommées

- Données existantes dans l'enquête INCA 99

Réalisée en 1999 par le Crédoc avec l'appui de la DGAI et de l'Afssa l'enquête individuelle nationale sur les consommations alimentaires (INCA 99) a permis de recueillir les consommations d'un échantillon représentatif de 1985 personnes de plus de 15 ans et de 1018 enfants de 3 à 14 ans. Le relevé de consommation s'est déroulé sur une période de 11 mois à l'aide de carnets de consommation permettant la saisie des prises alimentaires sur sept jours consécutifs. Les quantités consommées sont estimées à l'aide de mesures usuelles ou de photographies de portions. Les quantités de steaks hachés consommées lors de cette enquête ont fait l'objet d'une note technique¹¹. A noter que les sous-déclarants ont été exclus de ces calculs.

- Données existantes dans l'enquête INCA 2

L'enquête INCA 2, réalisée en 2006-2007 selon la même méthodologie, a permis d'analyser les évolutions de consommation depuis l'enquête INCA 99. Elle a porté sur un échantillon représentatif de 2624 adultes et de 1455 enfants de 3 à 17 ans. Les quantités de steaks hachés consommées lors de l'enquête INCA 2 sont décrites ci-dessous. Les sous-estimateurs¹² ont été exclus de ces calculs. En plus de la consommation de steak haché, la consommation de hamburger, de cheeseburger et de double cheeseburger a été pris en compte, au prorata de la part de steak haché entrant dans leur composition (50% pour la hamburger, 30% pour le cheeseburger et 60% pour le double cheeseburger).

¹¹ Note technique OCA/CD/2004-215

¹² Personnes ayant déclaré des apports alimentaires très insuffisants par rapport à leur besoins, selon leur poids et taille, et ne déclarant pas être malades ou suivre un régime.

Tableau 3: Consommation de steaks hachés par tranche d'âge selon les enquêtes INCA 2 et Bébés TNS-SOFRES SFAE 2005

Tranches d'âge de la population française	[0-5 ans[[5-10 ans[[10-16 ans[+ de 16 ans
	[0-3ans[enquête bébés	[3-5ans[Enquête INCA 2	Enquête INCA 2		
Nombre de personnes interrogées (non sous-déclarants)	706	95	383	671	2213
Nombre de jours enquêtés	2118	665	2681	4697	15491
nombre de personnes ayant consommé des steaks hachés	134	64	254	428	988
Nombre d'actes de consommations de steak haché pendant l'enquête	156	93	411	660	1575
Nombre moyen de steaks hachés consommés par semaine (seuls consommateurs)	1,16	1,45	1,62	1,54	1,59
Nombre moyen de steaks hachés consommés par semaine	0,22	0,98	1,07	0,98	0,71
Consommation de steaks hachés par an et par personne	26,88	50,91	55,80	51,15	37,11
Population française au 1 ^{er} janvier 2006 (INSEE)(en millions)	2,29	1,54	3,73	4,46	49,15
Consommation de steaks hachés par an pour la population française (en millions)	61,56	78,39	208,14	228,12	1818,97
part de la consommation de steaks hachés en France par tranche d'âge	5,83%		8,67%	9,50%	75,99%
Consommation moyenne (en g) par acte de consommation (seuls consommateurs)	51,82	76,04	94,11	115,43	126,14*

*pour les 16-17 ans uniquement

- Données existantes dans l'étude TNS-Sofres 2005/université de Bourgogne sur les consommations alimentaires des nourrissons et enfants français en bas âge

L'étude TNS-Sofres 2005, menée en collaboration avec université de Bourgogne à la demande du syndicat français des aliments de l'enfance, a collecté les consommations (aliments, boissons) d'un échantillon de 713 enfants de 1 à 36 mois durant 3 jours à partir d'un carnet de consommation. Pour garantir la fiabilité des données recueillies, les enfants nourris au sein ou fréquentant une collectivité ont été exclus de cette enquête.

Les données issues de cette enquête sont présentées dans le tableau précédent pour la catégorie des enfants de moins de 3 ans. Dans l'enquête INCA2, comme dans l'étude « bébés », les aliments composés pouvant contenir du steak haché (hachis Parmentier, par exemple) ne sont pas pris en compte dans ce tableau.

5. Lieu de consommation

L'enquête INCA 2 renseigne également le lieu de la prise du repas (à domicile, chez des amis ou en restauration collective¹³ ou commerciale) des adultes et des enfants de plus de 3 ans.

6. Modes de consommation (niveaux de cuisson et température atteinte à cœur en fin de cuisson)

- selon l'enquête INCA 99

L'étude INCA 99 compote, outre le recueil des quantités consommées, un volet sur les « pratiques culinaires de consommation » qui est rempli directement par l'enquêté adulte. Cette partie ne concerne que les adultes et est auto-administrée, c'est-à-dire remplie par la personne enquêtée. Le niveau habituel de cuisson de la viande rouge consommée lors de cette enquête ont fait l'objet d'une note technique¹⁴ sur les modes de cuisson des viandes en France.

La question posée était la suivante :

« B23. « *Quand vous consommez de la viande rouge, la mangez-vous le plus souvent...* » (une seule réponse possible)

Les réponses obtenues, en pourcentage, sont les suivantes :

Tableau 4 : fréquence des modalités habituelles de cuisson des steaks hachés selon l'enquête INCA 99

Modalité de cuisson	Pourcentage de réponses
1. Crue	0,8%
2. Bleue	10,9%
3. Saignante	35,2%
4. A point	36,8%
5. Très cuite	13,8%
6. Ne sais pas	2,6%

Outre que cette enquête ne permet pas le recueil de ces informations chez les enfants de moins de 15 ans, elle présente également l'inconvénient de ne pas faire la distinction entre les différents types de viandes rouges (bœufs, agneau, cheval). Elle ne permet de décrire que les pratiques « habituelles » et non les pratiques occasionnelles.

Une partie de ces inconvénients, mais pas tous, seront corrigés dans l'enquête INCA 2.

- selon l'enquête INCA 2

Afin de mieux connaître certaines pratiques en lien avec l'alimentation, un auto-questionnaire a été rempli par les personnes interrogées dans le cadre de l'enquête INCA 2. Une question porte ainsi sur le niveau habituel de cuisson de certaines viandes consommées, dont le steak haché.

A défaut de mesures de température à cœur des steaks hachés consommés, données qui seraient difficilement disponibles en raison du très faible équipement des consommateurs français en thermomètres de cuisson¹⁵, les termes culinaires usuellement utilisés en restauration commerciale (« bleu », « saignant », « à point », « bien cuit », « très cuit ») ont été employés, comme pour l'enquête INCA 99. Il n'a pas été vérifié, dans le cadre de ces enquêtes, que ces termes étaient compris de manière uniforme par les personnes interrogées et il est donc admis, de manière implicite, que c'est le cas.

La question posée était la suivante : « *Lorsque vous consommez ces viandes cuites, indiquez le degré de cuisson habituel...* » (une seule réponse possible). Différents types de viandes ont été distingués, en particulier parmi les viandes de bœuf. Ainsi le niveau de cuisson des steaks hachés a été recueilli de manière distincte des autres viandes de bœuf (rôti d'une part, steak, entrecôte, côte d'autre part).

¹³ On peut ainsi distinguer la restauration collective à caractère social (crèches, écoles, maisons de retraite, hôpitaux,...), qui présente un public généralement ciblé, de la restauration commerciale (restaurants, cafétérias, brasseries, ...) qui ne vise pas un public particulier.

¹⁴ Note technique OCA/JLV/2004-250.

¹⁵ Contrairement à d'autres pays comme les Etats-Unis ou le Canada, où l'usage de ces outils est très fortement recommandé pour vérifier le niveau de cuisson des aliments.

Les réponses obtenues, en pourcentage, sont les suivantes :

Tableau 5 : fréquence des modalités habituelles de cuisson des steaks hachés selon l'enquête INCA 2 (N=2355)

Modalité de cuisson	Pourcentage de réponses
1. Bleu	6,9%
2. Saignant	31,1%
3. A point	34,3%
4. Bien cuit	22,4%
5. Très cuit	5,3%

Par contre, le niveau de cuisson de chacun de steaks consommés pendant la semaine d'enquête n'est pas renseigné lors du recueil des consommations alimentaires.

La consommation de viande de bœuf crue (tartare, carpaccio...) est également renseignée dans l'auto-questionnaire à l'aide de la question « vous arrive t'il de consommer de la viande de bœuf crue ? ». Plusieurs modalités de réponse semi-quantitatives permettaient de proposer des classes de fréquence de consommation (« jamais », « moins d'une fois par mois », « une à trois fois par mois », « plusieurs fois par semaine »).

Tableau 6 : Fréquence de consommation de viande de bœuf en absence de cuisson selon l'enquête INCA 2 (N=629)(les personnes déclarant ne pas consommer de viande de bœuf crue et les non réponses sont exclues)

occurrence	Pourcentage de réponses
moins d'une fois par mois	6,8%
une à trois fois par mois	17,6%
plusieurs fois par semaine	75,6%

Les questions sur le niveau de cuisson des steaks hachés et sur la consommation sans cuisson de viande de bœuf figuraient uniquement dans l'auto-questionnaire destiné aux adultes : le niveau de cuisson de steaks hachés consommés par les enfants n'est donc pas accessible par le biais de cette enquête.

- Selon l'enquête spécifique menée par le groupe de travail AQR STEC (enfants)

L'enquête a permis de recueillir, selon un protocole légèrement distinct suivant que le questionnaire soit proposé par un des enquêteurs ou par un pédiatre, le niveau de cuisson des steaks hachés consommés à la maison. Le recueil des niveaux de cuisson a été facilité par l'emploi d'une planche photographique permettant d'identifier l'aspect du steak « à la coupe » suivant 4 modalités de cuisson. Dans cette enquête, comme dans l'enquête INCA 2, une évolution du niveau de cuisson en fonction de l'âge a été notée, avec une cuisson moins poussée quand l'âge augmente.

Tableau 7 : fréquence des modalités habituelles de cuisson des steaks hachés consommés à la maison selon l'enquête spécifique menée par le groupe de travail AQR STEC (N=571)

Modalité de cuisson	Pourcentage de réponses
1. Cru	0,7%
2. Saignant	15,3%
3. Rosé	49,1%
4. Bien cuit	31,1%
5. Ne sais pas	0,8%
6. Fréquence manquante	3,1%

▪ Selon des données des professionnels de la restauration collective

S'il est difficile de collecter des informations sur le niveau de cuisson des steaks hachés à domicile ou en restauration commerciale, cette information devrait être plus facilement accessible en restauration collective destinée à des personnes sensibles (crèches, écoles, hôpitaux, etc...).

En effet, une note d'information interministérielle (DGAL/SDSSA/O2007-8001 du 13 février 2007) destinée aux professionnels de la restauration collective précise des recommandations concernant la cuisson des steaks hachés dans le cadre de la prévention des infections à *Escherichia coli* O157:H7, c'est à dire une cuisson à cœur à 65°C (ou tout autre procédé assurant une efficacité équivalente) des steaks hachés destinés à des personnes sensibles.

Il pourrait donc être envisagé de considérer que tous les steaks consommés en restauration collective ou commerciale (le lieu de repas est précisé dans l'enquête INCA 2) sont cuits selon les recommandations de cette note de service. Néanmoins, il n'est pas certain que ces recommandations soient systématiquement appliquées par les professionnels de la restauration collective, en l'absence d'évaluation de l'application de cette note d'information.

ANNEXE C – PRESENTATION DE LA PROGRAMMATION SAS.

```

/*-----
                                     Modèle
-----*/
data stec.simul;
do NGBF= 2 to 6; /*Contamination en log10*/
do n= 400, 2400, 3200, 4800, 5600, 8000, 8800, 12000,16000; /*Taille de la m el ee en
nombre de steaks*/
do b=0.1,0.5, 1, 2, 3,1000000; /*Paramètre d'homog enit e en log10*/
do s=1 to 1000; /*Nombre de simulations*/
probm=0; /*Probabilité de tomber malade*/
cas=0; /*Nombre de cas*/
prev=0; /*Prévalence*/
Ndistributed=0; /*Nombre d'ufc distribu es*/

do steak=1 to n;
  if steak=n then Nj=(10**NGBF-Ndistributed)*(Ndistributed<10**NGBF);
  else do;
    if 10**NGBF<=Ndistributed then Nj=0;
    else do Nj= Rand ('binomial',rand('beta',b,b*(n-
steak)), (10**NGBF-Ndistributed));
    end;
  end;

Ndistributed=Ndistributed+Nj;
cuisson=rand('Table',0.162,0.5,0.338); /*Destruction thermique durant la cuisson*/
RD=(0+ranuni(0)*(0.9-0))*(Cuisson=1)+(0.2+ranuni(0)*(1.4-
0.2))*(cuisson=2)+(2.8+ranuni(0)*(1.2-2.8))*(cuisson=3);
LjC=Nj*Rand('Bern',0.24);/*24% de steaks hach es consomm es par les enfants de moins
de 16 ans*/
if LjC=0 then NjC=0;
  else NjC=Rand('Binomial', (10**-rd),LjC);
prob=1-(1-1.13E-3)**NjC; /*1,13E-3 correspond à la dose réponse*/

if prob=0 then x=0;
  else x=rand('bern',prob);
cas=cas+x;
ProbM=ProbM+prob/n;
prev=prev+(Nj>0)/n;
end;
output;
end;
end;
end;
end;
run;

/* Calcul et représentation graphique du risque d'observer au moins 2 cas */
data stec.simul2;
set stec.simul;
expected=probm*n;
risque=log10(probm);
risque2=1-CDF('poisson',1,probm*n);
risque2=log10(risque2);
run;

```

```
proc sort data=stec.simul3;
by n;
run;
goptions device=activex;
proc sgplot data=stec.simul3;
  dot NGBF/ response=risque2 stat=mean
    limitstat=stddev numstd=1 group=b;
    yaxis display=(novalues noticks) label="N";
    xaxis values=(-6 to 0 by 1) label="Risque d'observer au moins 2 cas
de SHU";
  by n;
run;
goptions reset=all device=activex;

/* Calcul et représentation graphique du pourcentage de steaks contaminés */
data stec.simul3;
set stec.simul2;
ngbf=ngbf+(b=1000000)*(.1)+(b=3)*(.05)+(b=2)*(0)+(b=1)*(-.05)+(b=0.5)*(-
.1)+(b=0.1)*(-.15);
prev2=prev*100;
run;

proc sort data=stec.simul3;
by n;
run;
goptions device=activex;
proc sgplot data=stec.simul3;
  dot NGBF/ response=prev2 stat=mean
    limitstat=stddev numstd=1 group=b;
    yaxis display=(novalues noticks) label="N";
    xaxis values=(0 to 100 by 20) label="Pourcentage de steaks hachés
contaminés";
  by n;
run;
goptions reset=all device=activex;
```

```

/*-----
          Efficacité des plans d'échantillonnage
-----*/

/*Création d'une table contenant tout les croisement b*s*pos */
data stec.base2;
do b=-2,-1.5,-1,-0.5,0,0.5,1,1.5,2,2.5,3; /*Paramètre d'homogénéité en log10 */
do s=1 to 1000; /*Nombre de simulations */
do pos=0,1;
output;
end;
end;
end;
run;
proc sort data=stec.base2;
by b s pos;
run;

/* Répartition de la contamination dans un plan de 10*10 */
%let n=100; /*Nombre d'unités*/
%let b=1000; /*Charge totale en ufc */
data stec.partition_b;
do s=1 to 1000;
do total=&b;
do b=-2,-1.5,-1,-0.5,0,0.5,1,1.5,2,2.5,3;
Ndistributed=0;
do i=1 to &n;

if i=&n then Nj=(total-Ndistributed)*(Ndistributed<total);
           else do;
               if total<=Ndistributed then Nj=0;
               else do Nj= Rand ('binomial',rand('beta',10**b,(10**b)*(&n-
i)),(total-Ndistributed));

                           end;
                           end;
Ndistributed=Ndistributed+Nj;
do j=1 to Nj;
x=((i-1)-10*floor((i-1)/10))+ranuni(0); /*Valeur des x et y pour les
différents ufc */
y=floor((i-1)/10)+ranuni(0);
output;end;end;end;end;end;
run;
proc sort data=stec.partition_b;
by s;
run;

/* Création d'une prise d'essai */
data stec.prisel_2 (drop=i);
do s=1 to 1000;
x1=9*ranuni(0)+ranuni(0);
y1=9*ranuni(0)+ranuni(0);
total=&b;
output;
end;
run;

data stec.partition2bis_b;
merge stec.partition_b stec.prisel_2;
by total s;
run;

```

```

%macro pos;
data stec.partition3bis_b;
set stec.partition2bis_b;
pos=0;
%do i=1 %to 1;
if 0<sqrt((x&i-x)**2+(y&i-y)**2)<0.5 then pos+1; /*On regarde si des ufc sont situés
à moins de 0.5 du point d'échantillonnage*/
else pos+0;
result&i=sqrt((x&i-x)**2+(y&i-y)**2);
%end;
run;
%mend;
%pos;
proc sort data= stec.partition3bis_b;
by b s;
run;
data stec.partition3bis_b;
set stec.partition3bis_b;
if pos>1 then pos=1;
run;
proc freq data=stec.partition3bis_b noprint;
by b s;
table pos /out=stec.freqbis_b all;
run;
proc sort data=stec.freqbis_b;
by b s pos;
run;
data stec.freqbis_b;
set stec.freqbis_b;
if pos>1 then pos=1;
run;
data stec.freq2bis_b (drop=un);
merge stec.freqbis_b stec.base2 ;
by b s pos;
if not (un) then i=0;
run;
data stec.freq2bis_b;
set stec.freq2bis_b;
if count=. then count=0;
run;
data stec.freq2bis_b;
set stec.freq2bis_b;
if count>0 and pos=1 then detect=1;
else detect=0;
run;
proc freq data=stec.freq2bis_b;
by b;
where pos=1;
table detect /out=stec.freq3bis_b;
run;
data stec.freq3bis_b;
set stec.freq3bis_b;
if detect=0 then delete;
nb_echant=1;
run;

/* Création de 10 prises d'essais */
data stec.prisel0_2 (drop=i) ;
array x(10) x1-x10;

```

```

array y(10) y1-y10;
do s=1 to 1000;
  do i=1 to 10;
    x(i)=9*ranuni(0)+ranuni(0); /* Valeur des x et y pour les 10 prises d'essais
  */
    y(i)=9*ranuni(0)+ranuni(0);
  end;
  total=&b;
  output;
  end;
run;
data stec.partition2_b;
merge stec.partition_b stec2.prisel0_2;
by total s;
run;
%macro pos;
data stec.partition3_b;
set stec.partition2_b;
pos=0;
%do k=1 %to 10;
if 0<sqrt((x&k-x)**2+(y&k-y)**2)<(0.5/sqrt(10)) then pos+1; /* Pour les 10 échant,
on divise la taille de 1 échant par racine de 10*/
else pos+0;
result&k=sqrt((x&k-x)**2+(y&k-y)**2);
%end;
run;
%mend;
%pos;
data stec.partition3_b;
set stec.partition3_b;
if pos>1 then pos=1;
run;
proc sort data= stec.partition3_b;
by b s;
run;
proc freq data=stec.partition3_b noprint;
by b s;
table pos /out=stec.freq_b all;
run;
proc sort data=stec.freq_b;
by b s pos;
run;
data stec.freq_b;
set stec.freq_b;
if pos>1 then pos=1;
run;
data stec.freq2_b (drop=un);
merge stec.freq_b stec.base2(in=un);
by b s pos;
if not(un)then i=0;
run;
data stec.freq2_b;
set stec.freq2_b;
if count=. then count=0;
run;
data stec.freq2_b;
set stec.freq2_b;
if count>0 and pos=1 then detect=1;
else detect=0;

```

```
run;
proc freq data=stec.freq2_b;
by b;
where pos=1;
table detect /out=stec.freq3_b all;
run;
data stec.freq3_b;
set stec.freq3_b;
if detect=0 then delete;
nb_echant=10;
run;

data stec.sensibilite;
set stec.freq3_b stec.freq3bis_b;
sensibilite=percent;
run;

goption reset=all;
symbol1 v=star c=red interpol=SM20;
symbol2 v=star c=blue interpol=SM20;
axis1 label=("log(b)");
proc gplot data=stec.sensibilite;
plot sensibilite*b=nb_echant/haxis=axis1 vaxis=0 to 100 by 10;
run;
quit;
```