



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 juillet 2018

AVIS

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

**relatif au protocole de reprise de la commercialisation de reblochons
proposé par l'entreprise Chabert**

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

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

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

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 13 juillet 2018 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis de l'Anses sur le projet de plan d'échantillonnage proposé par Chabert pour accompagner la reprise de commercialisation des reblochons fabriqués par l'entreprise.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le contexte présenté par la DGAI dans la lettre de saisine est le suivant :

Le 9 mai 2018, Santé publique France a alerté les ministères de la santé et de l'agriculture de la détection de cas de syndrome hémolytique urémique (SHU) infantiles potentiellement groupés car infectés par la même souche bactérienne (*E. coli* O26:H11 stx2+ eae+ ehxA). Les investigations qui ont suivi ont permis d'identifier une source alimentaire commune : des reblochons fabriqués à la fromagerie Chabert de Cruseilles (74).

La production fut rapidement arrêtée mais la nécessité de poursuivre la collecte du lait a conduit le préfet à autoriser, par arrêté du 30 mai 2018, la reprise de la transformation du lait sous réserve de le pasteuriser. Compte tenu des contraintes définies par le cahier des charges de l'AOP reblochon, cette mesure impose à l'exploitant de renvoyer le lait vers une autre fromagerie et lui interdit de fabriquer du reblochon.

Dans le même temps, des investigations ont été conduites dans les fermes qui livraient du lait à la fromagerie de Cruseilles : les filtres à lait utilisés chaque jour du 14 mai au 7 juin 2018 ont été analysés. Chez quatre producteurs de lait, une souche *E. coli* O26:H11 stx+ eae+ a été identifiée par le laboratoire national de référence (LNR), mais le cluster exact identifié chez les enfants malades n'a été retrouvé que dans une seule exploitation.

La fromagerie a repris sa production de reblochon (au lait cru) depuis le 18 juin et affine sa production dans l'attente de pouvoir la remettre sur le marché. Les laits des quatre producteurs dont au moins une analyse a permis de détecter une souche d'*E. coli* O26:H11 sont écartés de la production de reblochon et pasteurisés. L'entreprise Chabert souhaite également arrêter les analyses systématiques des filtres à lait chez les autres producteurs.

Après échange avec la DGAI le 16 juillet 2018, la question initiale a été reformulée comme suit : la saisine vise à recueillir l'avis de l'Anses sur le protocole de reprise de la commercialisation de reblochons proposé par l'entreprise Chabert.

Par ailleurs, l'avis de l'Anses est sollicité sur le caractère assainissant du procédé de fabrication des fromages « Cœur de Savoie » et « abondance » fabriqués pendant la période à risque.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence (GECU) « EHEC Reblochon » entre le 16 et le 20 juillet 2018.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

L'expertise s'est notamment appuyée sur les éléments joints par la DGAI à la lettre de saisine :

- un courrier de l'entreprise Chabert concernant le protocole de reprise ;
- une étude d'impact, menée par ACTALIA, pour le compte de l'entreprise Chabert, de diverses mesures de maîtrise sur le pourcentage de rejets de lots et la réduction du risque de SHU par une approche d'appréciation quantitative des risques (AQR) ;
- les diagrammes de fabrication des fromages « Cœur de Savoie » et « abondance ».

Par ailleurs, l'entreprise Chabert, ACTALIA et le CNIEL ont été auditionnés par le GECU le 17 juillet 2018.

Suite à cette audition, des documents et des informations complémentaires ont été transmis à l'Anses :

- les résultats d'autres scénarios testés dans le modèle et la vérification de certains paramètres du modèle ;
- le rapport d'étude du projet interprofessionnel portant sur la « maîtrise et la gestion des STEC dans les fromages à pâtes pressée non cuite » (rapport MaGeSTEC) ;
- La synthèse des résultats d'un projet relatif au comportement de souches STEC lors de la fabrication, l'affinage et la conservation de fromage au lait cru (5 technologies) ainsi que le détail des résultats obtenus sur un fromage à pâte pressée cuite ;
- des résultats d'autocontrôles relatifs à *E. coli* dans les fromages « abondance » en fin d'affinage pour la période du 2 janvier 2017 au 28 juin 2018 ;
- des résultats d'autocontrôles relatifs aux STEC sur les filtres de traite et les laits de ferme entre le 15 mai et le 14 juin 2018.

Ces éléments ont été transmis à l'Anses les 18 et 19 juillet 2018.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GECU

3.1. Rappel des définitions de l'avis de l'Anses du 18 mai 2017

Sur la base des signes cliniques observés chez les malades, les souches d'*Escherichia coli* pathogènes sont regroupées en pathovars (ou pathotypes) parmi lesquels les ***E. coli* entérohémorragiques (EHEC** pour *Enterohemorrhagic E. coli*). Chez l'Homme, les EHEC sont responsables de troubles variés allant d'une diarrhée aqueuse bénigne à une colite hémorragique pouvant évoluer vers des formes graves : syndrome hémolytique et urémique (SHU), principalement chez le jeune enfant, ou micro-angiopathie thrombotique (MAT) chez l'adulte.

Toute souche d'*E. coli* isolée dans les aliments doit être considérée comme une EHEC si elle possède les gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* et *eae* ou d'autre(s) gène(s) codant un système d'adhésion au tube digestif de l'Homme. Une souche d'*E. coli* possédant un gène *stx* est dénommée *E. coli* productrice de shigatoxine ou STEC (« *shigatoxin-producing E. coli* ») sans que cela présage de la virulence de la souche.

Certains sérotypes d'EHEC sont plus fréquemment associés à une maladie grave (SHU). La classification proposée par le panel BIOHAZ de l'EFSA en 2013 a été actualisée en se fondant sur les nouvelles données épidémiologiques françaises et européennes (2011-2015). L'Anses propose ainsi d'inclure le sérotype O80, troisième sérotype isolé dans le cas de SHU en France, dans le groupe I des EHEC à risque élevé (cf. tableau 1) ;

Tableau 1. Classification des souches *stx+* selon leur risque pour la santé publique en France (Anses, 2017)

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

Toutefois, au regard des données disponibles sur la contamination des réservoirs et des aliments, la liste des sérotypes d'EHEC à rechercher en priorité dans les aliments demeure valide : **O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28, et O111:H8**. Cette liste pourra être révisée en fonction de nouvelles données épidémiologiques, et en particulier des résultats des investigations concernant la source du sérotype O80:H2.

La mise en évidence des différents marqueurs de virulence au sein d'une même souche permet d'estimer son caractère pathogène. Néanmoins, l'interprétation des résultats doit tenir compte du contexte épidémiologique dans lequel le prélèvement a été effectué ainsi que de la sensibilité et de la spécificité des méthodes analytiques utilisées.

3.2. Description détaillée du protocole de reprise de la commercialisation des fromages par l'entreprise CHABERT

Avant mai 2018, l'entreprise Chabert ne recherchait que les *E. coli* du sérotype O157 dans les fromages en cas de dépassement de la limite de 100 000 UFC/g en *E. coli*. Cet indicateur

d'hygiène était analysé sur un à deux fromages par jour de fabrication pour tous les lots de reblochon.

Le protocole de reprise proposé par l'entreprise Chabert repose d'une part sur un tri du lait entrant dans la fabrication des reblochons et d'autre part sur une analyse des reblochons.

- Le lait issu de chaque producteur est prélevé lors de la collecte par des préleveurs automatiques installés sur les camions. Ces échantillons de 50 mL sont conservés en échantillothèque et un dénombrement de *E. coli* est réalisé sur certains d'entre eux. Cette analyse est effectuée par un laboratoire interprofessionnel 3 fois par mois, soit à une fréquence d'environ 1 fois tous les 10 jours.

A la réception des résultats, lorsque la contamination est inférieure à 50 UFC/mL, le lait entre dans la fabrication des fromages. En revanche, si la concentration est supérieure à 50 UFC/mL, le lait issu de ce producteur (ce tank et les traites suivantes) est isolé en attendant de résultats complémentaires. Les analyses complémentaires consistent à rechercher les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques des 5 sérogroupes pathogènes majeurs ci-après dénommés « top 5 » (*E. coli* possédant les gènes *stx1* et /ou *stx2* et *eae* et de sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 ou O145:H28) sur le filtre de la traite en cause et sur celui d'une 2^{ème} traite du même producteur par la méthode GENE-UP de bioMérieux. Si la détection d'EHEC du top 5 est confirmée sur un filtre ou dans le lait, celui-ci est pasteurisé. Si aucune EHEC du top 5 n'est isolée à partir des filtres et du lait, celui-ci est réintroduit dans le circuit de production et utilisé pour la fabrication des reblochons.

La limite microbiologique de 50 UFC/mL en *E. coli* est le seuil indicateur d'hygiène généralement retenu par les professionnels de la filière.

- Tous les lots de reblochons sont analysés en contrôle libératoire. Un lot correspond aux fromages issus d'un tank de collecte à la fromagerie¹ regroupant le lait de plusieurs producteurs soit 10 000 à 16 000 L (environ 10 à 16 producteurs). L'analyse consiste à rechercher les EHEC du top 5 dans deux fois 25 g prélevés dans trois à cinq fromages en début d'affinage (entre J1 et J3). Le lot est déclaré conforme en cas de non détection (absence de présence confirmée) d'EHEC du top 5 par la méthode GENE-UP de bioMérieux.

3.3. Synthèse du rapport ACTALIA

3.3.1. Présentation du modèle

Le modèle d'appréciation quantitative des risques (AQR) utilisé par ACTALIA pour aider à définir le protocole de reprise de commercialisation des reblochons de l'entreprise Chabert a été développé dans le cadre d'un projet interprofessionnel dénommé MaGeSTEC « Maîtrise et gestion des STEC dans les fromages à pâte pressée non cuite ». Le modèle AQR a pour objectif d'estimer l'impact de pratiques d'hygiène telles que le tri du lait ou la mise en place d'analyses libératoires sur la réduction du risque de SHU chez les enfants de moins de 15 ans. Ce modèle a été développé pour deux technologies au lait cru à pâte pressée non cuite (PPNC) : un modèle PPNC à affinage court, dont la technologie type est le reblochon fermier et laitier et un modèle PPNC à affinage long.

Le modèle AQR utilisé a fait l'objet d'une publication scientifique (Perrin *et al.* 2015). Le modèle considère l'évolution de la contamination du lait depuis la traite, jusqu'à la consommation de

¹ Une fromagerie est une fromagerie traditionnelle de montagne dans laquelle plusieurs producteurs locaux mettent en commun le lait de leur troupeau pour le transformer en fromage (source www.produits-laitiers.com).

portions de fromage. Il intègre trois parties. La première s'intéresse à la modélisation de la contamination du lait de ferme par voie fécale au moment de la traite. A l'issue de cette étape les niveaux de contamination en *E. coli*, STEC et EHEC du top 5 sont estimés. La seconde partie modélise la cinétique de comportement des STEC et EHEC du top 5 dans la matrice fromagère en fonction des paramètres environnementaux (température, pH, a_w , acide lactique). Le modèle permet d'estimer la prévalence et les niveaux de contamination des fromages à différentes étapes de la vie du produit. Enfin le dernier module permet d'estimer la dose ingérée d'EHEC du top 5 pour des portions de taille variable et des consommateurs de différents âges et d'aboutir ainsi à une estimation du risque de SHU par portion.

Le modèle PPNC à affinage court utilisé par ACTALIA a été paramétré avec les données des professionnels de la filière notamment pour estimer la contamination initiale en *E. coli* et les paramètres caractéristiques technologiques de fabrication. Il tient ainsi compte de la variabilité du procédé. La variabilité du comportement de différentes souches appartenant à plusieurs sérotypes a également été prise en compte (Miszczycha *et al.*, 2013) pour modéliser le comportement des EHEC du top 5 au cours du procédé de fabrication.

3.3.2. Hypothèses de modélisation

Toute démarche de modélisation repose sur de nombreuses hypothèses, notamment établies pour répondre à une absence de données et de connaissances. Les principales hypothèses associées à ce modèle concernent les niveaux de contamination en *E. coli*, en STEC et en EHEC du top 5 et la performance des méthodes analytiques.

Concernant la modélisation des concentrations en *E. coli*, STEC et EHEC du top 5, les laits mis en œuvre pour la fabrication des fromages sont des laits de mélange. Dans le modèle, on suppose que les distributions des concentrations en *E. coli* et en STEC dans le lait de mélange sont estimées à partir du mélange des laits de fermes. Pour chaque ferme, les données en *E. coli* observées dans les laits sont utilisées pour estimer la quantité de matières fécales contaminant la traite. A partir de cette quantité de matières fécales, la concentration en STEC est estimée à partir d'une loi de distribution décrivant la variabilité des niveaux de concentration en STEC dans les fèces de bovins. La distribution utilisée suppose une concentration inférieure à 1 000 UFC/g dans 95% des cas et inférieure à 10 000 UFC/g dans 99,5% des cas. Cette distribution génère donc 0,5 % d'animaux « super excréteurs », définis comme présentant des concentrations supérieures à 10 000 UFC/g de fèces. Enfin seule une fraction des STEC est considérée comme EHEC du top 5 (2.5%).

Concernant la performance des méthodes d'analyse, le modèle fait l'hypothèse que les méthodes de détection des EHEC du top 5 ont une sensibilité parfaite permettant de détecter une bactérie dans 25 g.

3.3.3. Présentation des résultats de simulation du modèle

- Résultats du modèle initial

Plusieurs scénarios ont été testés afin d'estimer l'impact du tri du lait et du contrôle des lots de fromages en début d'affinage (au stade où les concentrations en *E. coli* sont maximales, donc au moment où la probabilité de détection des EHEC du top 5 est maximale) sur le niveau de risque des lots de reblochon. Le rapport d'ACTALIA joint à la saisine permet d'évaluer l'impact des différents plans d'échantillonnage sur le risque de SHU (tableau 2).

En ce qui concerne le tri du lait, des compléments et de nouvelles simulations ont été demandés par le GECU pour être plus proche du protocole proposé par l'entreprise Chabert (une analyse par décade).

Tableau 2 : Efficacité des plans de contrôle des fromages selon le modèle développé par ACTALIA dans un scénario ne prenant pas en compte le tri du lait

| Plan de contrôle des fromages | | % de réduction du risque |
|-------------------------------|--|--------------------------|
| Plan 1 | 1 fois 25 g (5 g prélevés sur 5 fromages) | 24% |
| Plan 1bis | 2 fois 25 g (5 g prélevés sur 5 fromages) | 35% |
| Plan 2 | 2 fois 25 g (16,6 g prélevés sur 3 fromages) | 38% |
| Plan 3 | 3 fois 25 g (12,5 g prélevés sur 3 fromages) | 47% |
| Plan 4 | 2 fois 25 g (12,5 g prélevés sur 4 fromages) | 41% |
| Plan 4bis | 4 fois 25 g (12,5 g prélevés sur 4 fromages) | 56% |

- Résultats du modèle modifié

A la demande du GECU, le modèle a été modifié pour mieux prendre en compte le protocole de tri du lait proposé par l'entreprise Chabert et pour simuler un taux d'animaux « super excréteurs » plus important.

Deux taux de tri du lait ont été utilisés, un retrait de 1/10^{ème} du lait ne respectant pas la limite microbiologique de 50 UFC/mL en *E. coli* pour simuler la fréquence de contrôle d'un sur dix et un retrait d'un tiers de ces laits pour simuler l'effet du retrait des traites postérieures aux résultats non conformes.

Deux plans de contrôle ont été simulés, un plan consistant à analyser deux fois 25 g de fromage prélevés sur dix fromages (dix fois 5 g) et un plan consistant à analyser deux fois 25 g de fromages prélevés sur trois fromages (trois fois 16,6 g).

Deux distributions statistiques décrivant la concentration en STEC dans les fèces de bovins ont également été utilisées pour évaluer l'impact de la présence d'animaux « super excréteurs » sur la performance du plan de contrôle.

Le tableau 3 présente les résultats après modification du modèle. Le tri du lait seul permet de réduire le risque de 1 à 6%. Le contrôle des fromages seul permet de réduire le risque de 88 à 98%.

Tableau 3. Efficacité des mesures proposées dans le plan de contrôle selon le modèle développé par ACTALIA.

| Concentration en STEC dans les fèces ^(a) | Taux de tri du lait | Plan de contrôle des fromages | Taux de réduction du risque ^(b) | % de réduction du risque |
|---|---------------------|-------------------------------|--|--------------------------|
| Initiale | 1/10 | Aucun | 1,05 | 5% |
| Initiale | 1/3 | Aucun | 1,07 | 6% |
| Initiale | Aucun | 1bis | 8,3 | 88% |
| Initiale | Aucun | 2 | 9,0 | 89% |
| Initiale | 1/10 | 1bis | 8,4 | 88% |
| Initiale | 1/3 | 1bis | 8,1 | 88% |
| Initiale | 1/10 | 2 | 9,0 | 89% |
| Initiale | 1/3 | 2 | 9,2 | 89% |
| Modifiée | 1/10 | Aucun | 1,01 | 1% |
| Modifiée | Aucun | 2 | 47 | 98% |
| Modifiée | 1/10 | 2 | 47 | 98% |

(a) Initiale : distribution de Weibull de paramètre de forme 0,264 et de paramètre d'échelle 16,28 (générant 0,5% de concentrations supérieures à 10 000 UFC/g de fèces : animaux « super excréteurs »)

Modifiée : distribution de Weibull de paramètre de forme 0,2 et de paramètre d'échelle 16,28 (générant 2,5% de concentrations supérieures à 10 000 UFC/g de fèces : animaux « super excréteurs »)

(b) taux de réduction par rapport au risque de base sans tri du lait ni contrôle des fromages. (Par exemple, un scénario avec un taux de réduction de 47 correspond au risque de base divisé par 47).

3.4. Analyse du rapport ACTALIA par le GECU

3.4.1. Discussion des hypothèses de modélisation et des incertitudes

- Lien entre l'indicateur *E. coli* et les STEC

Le modèle utilisé par ACTALIA estime la quantité de STEC présentes dans le lait des bovins à partir de :

- (i) l'estimation de la quantité de matière fécale présente dans le lait, elle-même estimée à partir des concentrations en *E. coli* observées dans le lait et supposées dans les fèces des bovins,
- (ii) et de la concentration supposée en STEC dans les fèces des bovins.

Ce modèle génère donc une corrélation statistique entre les concentrations d'*E. coli* et de STEC (et donc d'EHEC du top 5) dans le lait. De façon générale, plus il y a d'*E. coli*, plus il y a également de STEC. Néanmoins, dans certains cas, le modèle est en mesure de simuler une concentration importante en *E. coli* dans le lait, traduisant une quantité de matière fécale importante, mais une concentration faible en STEC dans le lait si la concentration en STEC de ces matières fécales est faible. L'inverse est également vrai, le modèle simule parfois des concentrations faibles en *E. coli* mais importantes en STEC.

Ces simulations sont compatibles avec les observations ponctuelles de terrain qui montrent que les producteurs chez lesquels des EHEC du top 5 ont été détectées (présence sur les filtres de traite) ne présentaient pas de concentrations élevées en *E. coli* (< 20 UFC/mL).

- Concentration en EHEC chez les vaches excrétrices

Les résultats du modèle utilisé par ACTALIA sont sensibles à l'hypothèse sur la concentration en STEC dans les fèces de bovins. La distribution utilisée dans le modèle suppose une concentration inférieure à 1 000 UFC/g dans 95% des cas et inférieure à 10 000 UFC/g dans 99,5% des cas.

Certaines études ont montré que des animaux « super excréteurs », définis comme présentant des concentrations supérieures à 10 000 UFC/g de fèces, pouvaient représenter de 1 à 20% des bovins excréteurs de *E. coli* O157 (Omisakin et al., 2003 ; Stephen et al., 2009 ; Wells et al., 2009). Cette hypothèse place néanmoins le modèle dans une approche sécuritaire puisque les simulations consistant à générer des concentrations plus élevées avec 2,5% de « super excréteurs » montrent que la performance du contrôle libérateur est augmentée dans ce cas et que le risque de SHU est encore plus diminué que lorsque les concentrations en STEC dans les fèces sont plus faibles.

- Performance analytique de la méthode de détection

Concernant la performance analytique de la méthode de détection, le modèle considère une sensibilité parfaite (détection d'une cellule dans 25 g).

Il faut noter que la sensibilité des méthodes est différente en fonction des matrices et variable selon les souches et les protocoles utilisés par les laboratoires. La méthode interne du laboratoire national de référence (LNR) adaptée de la norme ISO TS 13136 :2012 présente une LOD50² en reblochon de 50 UFC/25g pour les souches EHEC O26 :H11, O157 :H7 et O103 :H2. Le GECU

² LOD50 : concentration pour laquelle la probabilité de détection du pathogène est de 50%

n'a pas connaissance de la LOD50 associée au protocole de détection utilisée par l'entreprise Chabert (GENE-UP incluant le protocole de confirmation).

Le GECU estime que les efficacités des plans de contrôle calculées grâce au modèle sont certainement surestimées ainsi que les réductions du risque associées.

3.4.2. Discussion des résultats du modèle

- Intérêt du tri du lait

Le tri du lait est une pratique intéressante car elle permet d'écartier de la fabrication les laits de producteurs qui contiennent potentiellement plus de STEC. Le rapport de l'étude MaGeSTEC v3 du 18 juillet 2018 indique que le tri du lait lorsqu'il est effectué de façon systématique avec un retrait impératif des laits présentant une concentration supérieure à 50 UFC/ml en *E. coli* permet de réduire le risque de SHU de 42%.

Dans le modèle développé par ACTALIA pour l'entreprise Chabert, ce tri se traduit par une élimination de 1/10^{ème} à un tiers (un tiers pour traduire le retrait potentiel du lait issu des traites ultérieures) du lait de ferme dont la contamination en *E. coli* est supérieure à 50 UFC/mL. Ces taux de tri rendent la mesure peu efficace puisque le risque de SHU n'est divisé que d'un facteur 1,05 à 1,07 (5 à 6% de réduction du risque).

De plus, les quantités de lait exclues de la fabrication de reblochon dans le modèle sont probablement surestimées car, dans les faits, un contrôle défavorable en *E. coli* ne se traduit pas systématiquement par une élimination du lait. Celui-ci peut en effet être repris lorsque les analyses complémentaires ciblant les EHEC du top 5 sur filtre et lait sont favorables. Ce contrôle permet de garantir que le lait repris n'est pas contaminé fortement en EHEC du top 5, mais le seuil de détection de cette méthode n'est pas évalué. Il pourrait être idéalement de l'ordre de 1 UFC/50 mL de lait (soit 10^{-1,7} UFC/mL) dans le cas du contrôle du lait et sans doute plus bas pour l'analyse des filtres. Les données d'analyse sur les filtres de traite et le lait de ferme fournies par l'entreprise Chabert indiquent que sur 363 échantillons appariés, des EHEC du top 5 ont été retrouvés 4 fois sur les filtre et une seule fois dans le lait de ferme. A titre de comparaison, signalons que le modèle prévoit une contamination moyenne du lait de tank de collecte (lait de mélange correspondant à un lot mais plusieurs producteurs) en STEC (et non uniquement EHEC du top 5) de l'ordre de 10^{-2,74} UFC/mL et d'écart-type 10^{0,34} UFC/mL ce qui implique une probabilité d'environ 0,1% d'être supérieur au seuil de détection dans le lait.

L'efficacité du tri du lait pour la réduction du risque tel que proposé par l'entreprise Chabert et estimée par le modèle est donc faible. Elle doit de plus être considérée comme ayant une efficacité maximale si les laits trouvés supérieurs à 50 UFC/mL en *E. coli* étaient systématiquement éliminés de la fabrication. Dans les faits, leur reprise potentielle sous conditions pénalise probablement l'efficacité théorique maximale estimée.

- Intérêt du contrôle libératoire

Les plans d'échantillonnage testés pour le contrôle libératoire sont basés sur une recherche des EHEC du top 5 dans 25 g à 100 g de fromage avec des prélèvements effectués sur trois à cinq fromages par lot.

Le risque de SHU chez les enfants de moins de 15 ans diminue avec la mise en place du contrôle libératoire.

Ainsi, lorsque qu'il n'y a pas de tri du lait, le modèle indique que le risque est divisé par 9 (89% de réduction du risque) avec la mise en place d'une recherche dans deux fois 25 g.

Puis, les résultats indiquent une meilleure efficacité du contrôle libératoire lorsque la masse analysée augmente de 25 à 100 g ; le fait de prélever trois, quatre ou cinq fromages n'a en revanche que peu d'impact (voir tableau 2).

La probabilité de détecter un lot positif est multipliée par respectivement 1,8, 2,2 et 2,6 lorsque la masse analysée passe de 25 à 50 g, de 25 à 75 g et de 25 à 100 g. Cette meilleure détection des lots contaminés s'accompagne d'une réduction du risque de SHU. Le risque est divisé par respectivement 1,2, 1,4 et 1,6 lorsque la masse analysée passe de 25 à 50 g, de 25 à 75 g et de 25 à 100 g.

Le contrôle libératoire basé sur une recherche des EHEC du top 5 dans 50 g est considéré par l'entreprise Chabert comme un bon compromis entre le coût analytique, la probabilité de rejet des lots et la réduction du risque de SHU. Le risque de SHU est approximativement divisé par 9 (89% de réduction du risque), ce qui montre que le contrôle libératoire est considérablement plus efficace que le tri du lait tel qu'il est envisagé dans le protocole de l'entreprise Chabert.

3.5. Caractère assainissant des procédés de fabrication des fromages Cœur de Savoie et abondance

3.5.1. Description des procédés

Au cours de la fabrication des deux fromages plusieurs paramètres sont importants pour l'évolution des EHEC, le traitement thermique du lait rentrant en fabrication (cas du Cœur de Savoie uniquement), la température et la durée de l'étape de décaillage et la durée d'affinage.

Le Cœur de Savoie est une pâte pressée cuite/PPC de type gruyère, de la même famille que l'emmental. Lors de la fabrication du Cœur de Savoie, l'égouttage du caillé est accéléré par une montée de la température jusqu'à 55°C en une demi-heure puis un maintien d'au moins 12 minutes à cette température. L'activité de l'eau dans un emmental descend à 0,97 en trois mois (Steffen *et al.*, 1993). L'affinage dure au moins six mois entre 7 et 9°C.

L'abondance est une pâte pressée mi-cuite/PPMC de la même famille que le tilsiter. Lors de la fabrication de l'abondance, le décaillage dure aussi de 35 à 40 minutes mais la température atteint seulement 47°C. L'activité de l'eau du tilsiter a été mesurée égale à 0,96-0,98 (Northolt *et al.*, 1979). L'affinage de l'abondance dure au moins 100 jours à 10°C.

Pour les deux fromages, l'expulsion de la phase aqueuse est accélérée après le moulage par l'exercice d'une forte pression sur le caillé.

Le tableau 4 résume les principaux éléments technologiques pour les deux fromages.

Tableau 4 : Principaux paramètres de fabrication du Cœur de Savoie et de l'abondance ayant une influence sur la maîtrise d'*E. coli*

| Fromage | Traitement thermique du lait | Temps température pendant le décaillage des fromages | Durée d'affinage |
|-----------------------|-------------------------------------|--|-------------------------|
| Cœur de Savoie | Pasteurisation ou lait cru | Montée de la température jusqu'à 55°C en une demi-heure puis un maintien d'au moins 12 minutes à cette température | 6 mois minimum |
| abondance | Lait cru uniquement | 35 à 40 minutes à une température de 47°C | 100 jours minimum |

3.5.2. Revue des données bibliographiques disponibles

Une revue bibliographique par Bachmann & Spahr (1995) porte sur le devenir de *E. coli* (une souche de référence provenant d'une collection allemande) et de plusieurs espèces bactériennes pathogènes dans les fromages suisses durs (pâtes pressées cuites/PPC) et mi-durs (pâtes

pressées mi-cuites/PPMC) fabriqués avec du lait cru. Cet article relate en outre les résultats d'un travail expérimental avec un emmental (PPC) et un tilsiter (PPMC) fabriqués avec un laitensemencé avec environ 10^6 *E. coli*/mL.

Le devenir de huit souches d'EHEC, isolées dans des laits, appartenant aux sérotypes O157:H7, O103:H2, O145:H28 et O26:H11,ensemencées à raison de $10^{2.5}$ UFC/mL dans le lait de fabrication de plusieurs types de fromages, dont un fromage à pâte cuite pressée, a fait l'objet d'un travail expérimental par Miszczycha *et al.* (2013).

Les deux articles rapportent des résultats semblables pour les PPC : la concentration d'*E. coli* diminue et descend en dessous du seuil ou au seuil de détection dans le cœur des fromages (ce qui correspond à plus de deux réductions décimales dans l'article de Miszczycha *et al.* (2013), et à quatre réductions décimales dans l'article de Bachmann & Spahr (1995), O157:H7 étant plus fragile que O26:H11. L'article de Miszczycha *et al.* (2013) indique que ces bactéries peuvent survivre sur la croûte (qui n'est a priori pas consommée). L'article de Bachmann & Spahr (1995) montre en outre que la souche d'*E. coli* étudiée, après une multiplication pendant les deux premiers jours de fabrication, devient indétectable en un mois dans la pâte dure mi-cuite/PPMC.

La température élevée lors du décaillage, la diminution de l'activité de l'eau et du pH dans la pâte du fromage, et la durée d'affinage à une température égale et supérieure à 10°C (Bachmann & Spahr, 1995) sont évoqués pour expliquer la décroissance de la plupart des populations des bactéries pathogènes dans les PPC et PPMC.

3.5.3. Analyse des données d'autocontrôle sur abondance

Les résultats d'autocontrôles réalisés pour l'abondance montrent des niveaux de contamination en *E. coli* très variables. Deux tiers des fromages testés présentent des niveaux de contamination égaux ou inférieurs à 100 UFC/g en fin d'affinage. Les niveaux maximums rencontrés sur des fromages à trois mois d'affinage sont de l'ordre de 10^4 UFC/g. En cours d'affinage, les concentrations peuvent atteindre $8,5 \cdot 10^4$ UFC/g. Ces résultats montrent que l'affinage de l'abondance permet d'obtenir au moins une réduction décimale de la concentration en *E. coli*.

3.5.4. Synthèse sur les deux fromages

Le fromage Cœur de Savoie présente une technologie efficace contre les EHEC. La température et la durée de l'étape de décaillage permettent une inactivation thermique significative des EHEC. De plus les données bibliographiques sur l'affinage des fromages des pâtes pressées cuites montrent la poursuite de l'inactivation durant l'affinage.

Pour le fromage abondance, seule la phase d'affinage permet d'inactiver les EHEC. Les données d'autocontrôle montrent que des niveaux importants en *E. coli* dans ce type de fromage peuvent être observés. La bonne qualité microbiologique des laits mis en œuvre et/ou des durées d'affinage prolongées sont donc nécessaires pour la sécurité microbiologique de ces fromages.

3.6. Conclusions et recommandations du GECU

3.6.1. Protocole de reprise de production de l'entreprise Chabert

Le protocole de reprise de production de l'entreprise Chabert a, selon le modèle développé par ACTALIA, une efficacité qui repose essentiellement sur le contrôle libératoire systématique des lots de reblochons. La procédure de tri du lait telle qu'elle est proposée dans le protocole a un impact très limité sur la réduction du risque de SHU pour le consommateur. Cette surveillance de la qualité du lait reste indispensable pour maintenir une pression sur la maîtrise de l'hygiène de la traite.

Le GECU attire l'attention sur le fait que les efficacités des plans de contrôle simulés dans le modèle doivent être considérées comme des valeurs maximales sous l'hypothèse d'une sensibilité parfaite de la méthode d'analyse.

Le GECU recommande de déterminer la limite de détection de la méthode utilisée par l'entreprise Chabert pour la détection des EHEC du top 5 dans le reblochon. Il serait intéressant de comparer la méthode GENE-UP de bioMérieux avec une approche utilisant une PCR sur les gènes marqueurs des différents sérogroupes après une recherche des gènes *stx/eah*. Cette nouvelle limite de détection pourra être intégrée dans le modèle MaGeSTEC. Par ailleurs, il est recommandé aux professionnels de ne pas congeler ou conserver trop longtemps les échantillons de fromage avant analyse sous peine d'obtenir de faux résultats négatifs. Le GECU note que l'analyse des filtres semble présenter une meilleure sensibilité que l'analyse des laits et de ce fait, se révèle utile pour remonter à l'origine de la contamination.

L'entreprise Chabert pourrait réexaminer sa procédure de tri du lait pour améliorer son efficacité sur la réduction du risque, par exemple en augmentant la fréquence de contrôle.

3.6.2. Caractère assainissant du procédé de fabrication de Cœur de Savoie et abondance

Le fromage Cœur de Savoie présente une technologie efficace contre les EHEC. Pour le fromage abondance, seule la phase d'affinage permet d'inactiver les EHEC. La bonne qualité microbiologique des laits mis en œuvre et/ou des durées d'affinage prolongées sont donc nécessaires pour la sécurité microbiologique de ces fromages.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du groupe d'expertise collective d'urgence.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Reblochon, *Escherichia coli*, EHEC, fromage au lait cru, AQR
Reblochon, Escherichia coli, EHEC, raw milk cheese, QRA

BIBLIOGRAPHIE

ACTALIA (2018). Impact de diverses mesures de maîtrise sur le rejet de lots et le pourcentage de réduction du risque de Syndrome Hémolytique et Urémique en technologie Reblochon par une approche AQR. Rapport 18 VML0703 du 11 juillet 2018. ACTALIA Expertise Analytique, Unité de Microbiologie Laitière, La Roche sur Foron.

Anses (2017). Avis du 18 mai 2017 relatif à la détection des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière viande hachée bovine (saisine n°2016-SA-0121).

EFSA BIOHAZ Panel, (Efsa Panel on Biological Hazards). 2013. "Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment." EFSA Journal 11 (4):3138-n/a. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3138.

10.2903/j.efsa.2013.3138. Bachmann, H. P., & Spahr, U. (1995). The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 78(3), 476-483.

Miszczycha, S. D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-Aziza, F., Montel, M. C., Thevenot-Sergentet, D. (2013). Behavior of different Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes in various experimentally contaminated raw milk cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 150-158.

Northolt, M. D., Van Egmond, H. P., Paulsch, W. E. (1979). Penicillic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, 42(6), 476-484.

Omisakin F, MacRae, M., Ogden, I.D., Strachan, N.J.C. (2003) Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2444-2447.

Perrin, F., Tenenhaus-Aziza, F., Michel, V., Miszczycha, S., Bel, N., Sanaa, M. (2015) Quantitative risk assessment of Haemolytic and Uremic Syndrome linked to O157: H7 and non-O157: H7 Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* strains in raw milk soft cheeses. *Risk Analysis*, 35(1), 109-128

Stephens, T. P., T. A. McAllister, K. Stanford. (2009). Perineal swabs reveal effect of super shedders on the transmission of *Escherichia coli* O157:H7 in commercial feedlots. *Journal of Animal Science*, 87, 4151-4160.

Steffen, C., Eberhard, P., Bosset, J.O., Ruegg, M. (1993) Swiss-type varieties, in cheese: chemistry, physics and microbiology, Volume 2 - Major cheese groups, 2nd edition, Fox, P.F. ed. Springer-Science+Business Media, B.V., Dordrecht.

Wells, J. E., S. D. Shackelford, E. D. Berry, N. Kalchayanand, M. N. Guerini, V. H. Varel, T. M. Arthur, J. M. Bosilevac, H. C. Freetly, T. L. Wheeler, C. L. Ferrell, M. Koohmaraie. (2009). Prevalence and level of *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides of feed lot steers fed diets with or without wet distillers grains with solubles. *Journal of Food Protection*, 72, 1624-1633

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

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

GRUPE D'EXPERTISE COLLECTIVE D'URGENCE (GECU)

Président

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

Membres

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

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

Mme Estelle LOUKIADIS – VetAgroSup, Lyon. Méthodes analytiques, épidémiologie, microbiologie des aliments

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

PARTICIPATION ANSES

La coordination scientifique du projet a été assurée par l'Unité d'Evaluation des Risques liés aux Aliments (UERALIM) sous la supervision de Mme Nathalie ARNICH (adjointe au chef d'unité).

Coordination scientifique

Mme Marie-Bénédicte PEYRAT – Chef de projets scientifiques et techniques, UERALIM, Direction de l'Evaluation des Risques

Mme Pauline KOOH – Chef de projets scientifiques et techniques, UERALIM, Direction de l'Evaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Direction de l'Evaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

ENTREPRISE CHABERT

Mme Anne Laure BOMPAS – Direction industrielle

Mme Céline CHABERT – Direction

ACTALIA

M. Janushan CHRISTY – Ingénieur modélisation et traitement de données

Mme Valérie MICHEL – Responsable de l'Unité Microbiologie Laitière

CNIEL

Mme Fanny TENENHAUS-AZIZA – Service sécurité sanitaire