

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 24 avril 2018

AVIS

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

relatif à l'évaluation des protocoles d'échantillonnage des laits et fromages morbier et mont d'or en vue de réduire le risque épidémique de salmonellose

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 28 juillet 2016 par la Direction générale de l'alimentation (DGA) d'une demande d'avis relatif à l'évaluation des protocoles d'échantillonnage des laits et fromages morbier et mont d'or en vue de réduire le risque épidémique de salmonellose.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

En région Franche-Comté, les données de surveillance des salmonelles en filière bovine indiquent une contamination régulière des laits et de certains fromages au lait cru par *Salmonella* Dublin. Les protocoles d'autocontrôles dans les fromages et les laits ont été renforcés à partir de février 2016.

Malgré cette vigilance, le contrôle d'un lot réalisé après la mise sur le marché, mi-juillet 2016, a révélé la présence de *Salmonella* Dublin dans un établissement, entraînant des mesures correctives. Dans ce contexte, la question de l'efficacité des contrôles du lait et des fromages se pose.

La demande initiale a fait l'objet échanges avec la DGA en septembre 2016 et les questions reformulées sont :

1. Evaluer qualitativement le protocole d'échantillonnage, sa cohérence, ses limites.
2. Formuler des recommandations pour le recueil de données nécessaires à une future évaluation quantitative du risque.
3. Evaluer quantitativement l'efficacité des plans d'échantillonnage opérés en filière afin de réduire le risque de salmonellose.

Les questions 1 et 2 ont été traitées dans le cadre d'un appui scientifique et technique daté du 7 novembre 2016.

La question 3, traitée dans un second temps, est l'objet du présent avis de l'Anses, qui fait suite à une phase d'acquisition de données et de travaux d'appréciation quantitative du risque, menés au cours de l'année 2017.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisé (CES) « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » (BIORISK) sur la base d'un rapport initial rédigé par un groupe de trois rapporteurs. Les travaux ont été adoptés lors de la séance du 21 mars 2018.

L'expertise s'est appuyée sur :

- les données issues de rapports d'études transmis par les syndicats interprofessionnels AOP¹ Morbier - Mont d'or ;
- les données issues des analyses d'autocontrôles de recherche des salmonelles dans les laits de producteurs et les fromages (2011-2017) transmis par les syndicats interprofessionnels AOP Morbier - Mont d'or ;
- les informations transmises dans le cadre d'une demande d'appui scientifique et technique (AST) interne à l'Anses par le réseau *Salmonella* pour la période 2008-2015 concernant la filière laitière bovine française ;
- la littérature récente (cf. références bibliographiques) ;
- les données de consommation INCA3 (enquête de consommation individuelle française sur 2014-2015) issues d'une demande d'appui scientifique et technique (AST) interne à l'Anses ;
- les données issues d'un test de croissance des salmonelles dans les laits et fromages à pâtes pressées non cuites (Saint-nectaire) réalisé dans le cadre d'une étude co-financée par la DGAI en 2013-2014, transmises par le Pôle Fromager AOP Massif central ;
- les informations transmises par le syndicat interprofessionnel AOP Morbier - Mont d'Or, le CNIEL et ACTALIA lors d'auditions menées le 31 mars 2017 et le 01 mars 2018.

Le logiciel SAS® pour Windows version 9.4 a été utilisé pour l'ensemble des analyses.

Pour l'ensemble de l'étude, l'hiver correspond aux mois de janvier, février et mars, le printemps aux mois d'avril, mai et juin, l'été aux mois de juillet, août et septembre et l'automne aux mois d'octobre, novembre et décembre.

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).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES BIORISK

3.1. Etat des lieux des connaissances sur le comportement des salmonelles dans les matrices étudiées – Modes et voies de contamination du lait par les salmonelles

En Europe, les bactéries du genre *Salmonella* représentent la cause la plus fréquente d'épidémies d'origine alimentaire et la deuxième cause de maladies bactériennes d'origine alimentaire. En France, *Salmonella* est l'agent pathogène le plus fréquemment confirmé dans les foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) (Santé Publique France, 2016). Le réservoir principal de *Salmonella* spp. est le tractus gastro-intestinal des mammifères et des oiseaux. La transmission à l'Homme se fait essentiellement par la consommation d'aliments contaminés crus, peu cuits ou ayant subi une contamination après cuisson et/ou une conservation inadéquate. Ainsi, les fromages au lait cru, et particulièrement les pâtes molles, les pâtes persillées et les pâtes pressées non cuites, font partie des aliments susceptibles de véhiculer *Salmonella* spp.

Le règlement (CE) n°2073/2005 fixant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires définit un critère de sécurité relatif aux salmonelles pour les fromages au lait cru (absence dans 25 g dans les produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation).

¹ AOP : Appellation d'Origine Protégée (concerne un produit dont la production, la transformation et l'élaboration sont réalisées dans une zone géographique déterminée, selon un savoir-faire reconnu et un cahier des charges particulier)

3.1.1. Description de la spécificité du sérotype *Salmonella* Dublin

Salmonella enterica sous espèce *enterica* présente une grande variabilité antigénique permettant d'identifier plus de 1500 sérotypes différents. Parmi ceux-ci, certains sérotypes présentent une pathogénicité particulière pour l'Homme (à l'instar des sérotypes Typhi et Paratyphi ou Sendai), d'autres sont aussi pathogènes pour certaines espèces animales.

C'est, par exemple, le cas de *S. Choleraesuis* chez le porc, de *S. Gallinarum* et *S. Pullorum* chez *Gallus gallus* et *S. Dublin* chez le bovin. Les formules antigéniques de ces sérotypes présentent un antigène somatique différentiel : O9, correspondant à leur appartenance au séro groupe D. Il est intéressant de noter qu'au sein d'un sérotype donné, il peut exister des souches avec des propriétés différentes.

Dublin est un sérotype notoirement associé à la filière bovine qui a un impact économique important sur les troupeaux infectés présentant des signes cliniques. Ces derniers sont souvent observés chez les veaux sous forme de septicémies, de mortalités subites et de pneumonies. Mais les adultes peuvent également être affectés et présenter des diarrhées et être sujets à des avortements.

La persistance dans l'environnement de *S. Dublin* n'apparaît pas très différente de celle d'autres sérotypes (Kirchner *et al.*, 2012 ; Olsen *et al.*, 2012).

Les prélèvements composites d'environnement de la ferme sont recommandés pour y confirmer la présence de *S. Dublin* (Warnick *et al.*, 2003 ; Cummings *et al.*, 2010), mais ils restent à ce jour à optimiser en termes de sites de prélèvements et de nombre d'échantillons à prélever. Ainsi, la taille de l'échantillon et la diversité des sites prélevés restent déterminantes pour améliorer le seuil de détection de la technique.

En l'absence d'un tel plan d'échantillonnage optimisé, la capacité de détection dans les prélèvements fécaux et environnementaux par l'approche bactériologique est réputée faible (Nielsen, 2013). En complément de l'amélioration de l'échantillonnage évoquée plus haut, une optimisation spécifique du protocole de détection dans ces échantillons est clairement possible, en associant par exemple un enrichissement, dans des milieux dont la composition reste à optimiser, à une PCR spécifique (Krascsenicsova *et al.*, 2006 ; Zhai *et al.*, 2014) ou en optimisant le pré-enrichissement pour favoriser la revivification. En effet, il est possible que les cellules bactériennes, selon la nature du prélèvement et des traitements appliqués, se trouvent dans un état nécessitant une étape de revivification avant d'appliquer une méthode de détection (Goodman *et al.*, 2017 ; Laura *et al.*, 2017).

3.1.2. Modes et voies de contamination du lait par *Salmonella* Dublin

Différentes voies de contamination du lait par *S. Dublin* ont été décrites, elles ne sont pas exclusives les unes des autres :

1) Dans la phase aiguë de la salmonellose animale (période qui dure d'une à trois semaines à partir de la contamination, mais qui peut s'étendre jusqu'à neuf semaines) l'excrétion est possible dans le lait, les concentrations vont jusqu'à 10^8 bactéries par millilitre (Nielsen, 2013). En effet, du fait du caractère invasif de la bactérie, la glande mammaire peut être infectée. Dans ce cas, on constate dès la traite la présence de *Salmonella* dans le lait. Cette contamination est moins souvent mise en évidence que dans les matières fécales (Veling *et al.*, 2002) bien que la culture de la bactérie dans le lait soit plus facile que dans les matières fécales. Ceci renforce l'idée que le phénomène, bien que possible, n'est pas systématique même en cas de salmonellose clinique. On notera que, dans la phase aiguë, les signes cliniques permettent d'identifier l'animal et d'éviter la contamination du tank.

2) Après la phase aiguë, la contamination de la glande mammaire est considérée comme exceptionnelle et l'animal n'excrète plus dans le lait. Mais il reste excréteur dans les matières fécales, souvent de façon transitoire et pour des concentrations n'excédant pas 10^4 UFC par gramme (Wray et Wray, 2000). Dans un élevage hébergeant des animaux excréteurs asymptomatiques (statut qui peut aussi exister sans expression clinique préalable), la contamination du lait est le plus souvent d'origine fécale, intervenant par exemple lors de la traite. En effet, dans des conditions d'hygiène de traite non optimisées, les trayons ou l'équipement peuvent être contaminés par des matières fécales. Si la concentration en bactérie dans ces dernières apparaît variable selon la phase de la maladie, même des quantités faibles de fèces peuvent indirectement contaminer le lait par *Salmonella* lors de la traite. Le nombre de cellules de salmonelles contaminant le lait est souvent faible, la présence de la bactérie peut être révélée par des analyses des filtres du système de collecte précédant le tank. Ces analyses apparaissent plus sensibles que celles du lait de tank lui-même, l'effet de dilution jouant en défaveur de la capacité à détecter *Salmonella* dans ce dernier cas (Van Kessel *et al.*, 2011).

3) Dans des conditions reflétant un défaut d'hygiène, une mammite à *S. Dublin* peut apparaître de façon plus ou moins discrète et indépendamment d'une contamination systémique. Il s'agit là d'une colonisation du canal mammaire par la bactérie, sans signe clinique associé, qui peut s'accompagner d'une contamination du lait. Dans ces cas, la quantité de *Salmonella* émises dans le lait est faible et cette situation, bien que documentée, semble anecdotique (Nielsen, 2013).

3.1.3. Analyse des données transmises par le Réseau *Salmonella* relatives à la filière bovine laitière entre 2008 et 2015

Les données du réseau *Salmonella* s'appuient sur la collecte des isolats et des informations associées transmises volontairement par les laboratoires adhérents. L'analyse dans le cadre de l'appui scientifique et technique (AST) a porté sur les données collectées relatives à l'ensemble de la filière laitière de production d'origine bovine sur la période 2008-2015.

Il ressort clairement, sur les 2027 résultats de sérotypage, que les principaux isolats transmis pour cette filière appartiennent aux sérotypes Dublin (26%), Montevideo (25%) et Mbandaka (21%) (figure 1). A partir de 2013, l'isolement du sérotype Enteritidis et du variant monophasique de Typhimurium progresse régulièrement. Enfin, il est observé une augmentation de la transmission d'isolats de salmonelles à partir de matrices prélevées en élevages bovins entre 2008 et 2015, avec une augmentation de la diversité des sérotypes associés. A noter que ce constat est possiblement lié à une surveillance plus soutenue dans cette filière.

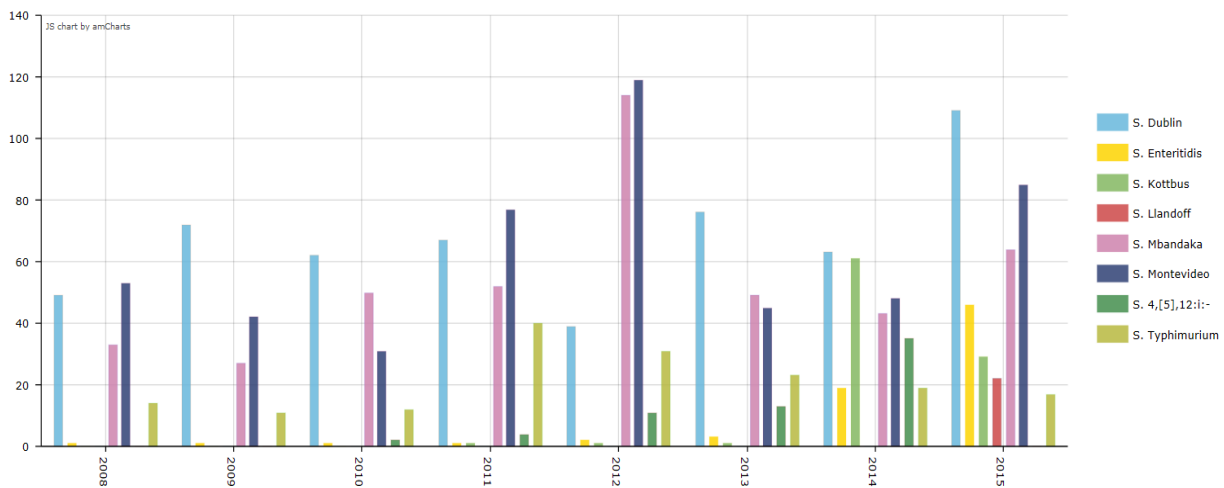


Figure 1. Répartition annuelle des résultats de sérotypage correspondant aux 8 principaux sérotypes isolés en élevages bovins laitiers entre 2008 et 2015 (n=1841) - Graphique issu du rapport d'appui scientifique et technique réalisé par Laboratoire de sécurité des aliments (LSAI).

En termes de saisonnalité, une augmentation récurrente des isolats transmis de sérotype Dublin est observée durant les mois d'août et septembre sur l'ensemble de la période étudiée, alors que cette augmentation n'est pas observée pour d'autres sérotypes tels que Montevideo, Mbandaka, Enteritidis et Typhimurium. Il semblerait par ailleurs que le nombre d'isolats transmis durant la période hivernale augmente régulièrement depuis 2012 (figure 2).

Dans le secteur du lait et des produits laitiers, le sérotype Dublin est à nouveau le sérotype très majoritairement isolé dans les prélèvements de lait cru, représentant 68% des isolats transmis (n=1836). Dans une moindre mesure, les autres sérotypes sont par ordre de fréquence décroissante, Montevideo, Mbandaka, Typhimurium, Enteritidis, d'importances variables d'une année sur l'autre.

Parmi les 532 isolats analysés et issus de fromages, le sérotype Dublin occupe une place prépondérante avec 63% des isolats, les autres sérotypes détectés par ordre de fréquence décroissante sont Typhimurium et son variant monophasique (26% au total), puis Enteritidis et Montevideo. L'analyse ciblée des isollements sur des fromages mont d'or fait apparaître la collecte de dix isolats durant la période (2008-2015) dont huit souches appartenant au sérotype Dublin.

De même, l'analyse spécifique des données collectées isolées de fromages morbier montre que 94% d'entre elles correspondent au sérotype Dublin (n= 274). C'est dans cette catégorie de produit que l'isolement du sérotype Dublin est le plus fréquent, avec de plus, pour cette production, une transmission de souches vers le réseau *Salmonella* plus élevée que pour les autres productions

fromagères, probablement en raison d'une surveillance accrue dans ce type de production, notamment à partir de 2012.

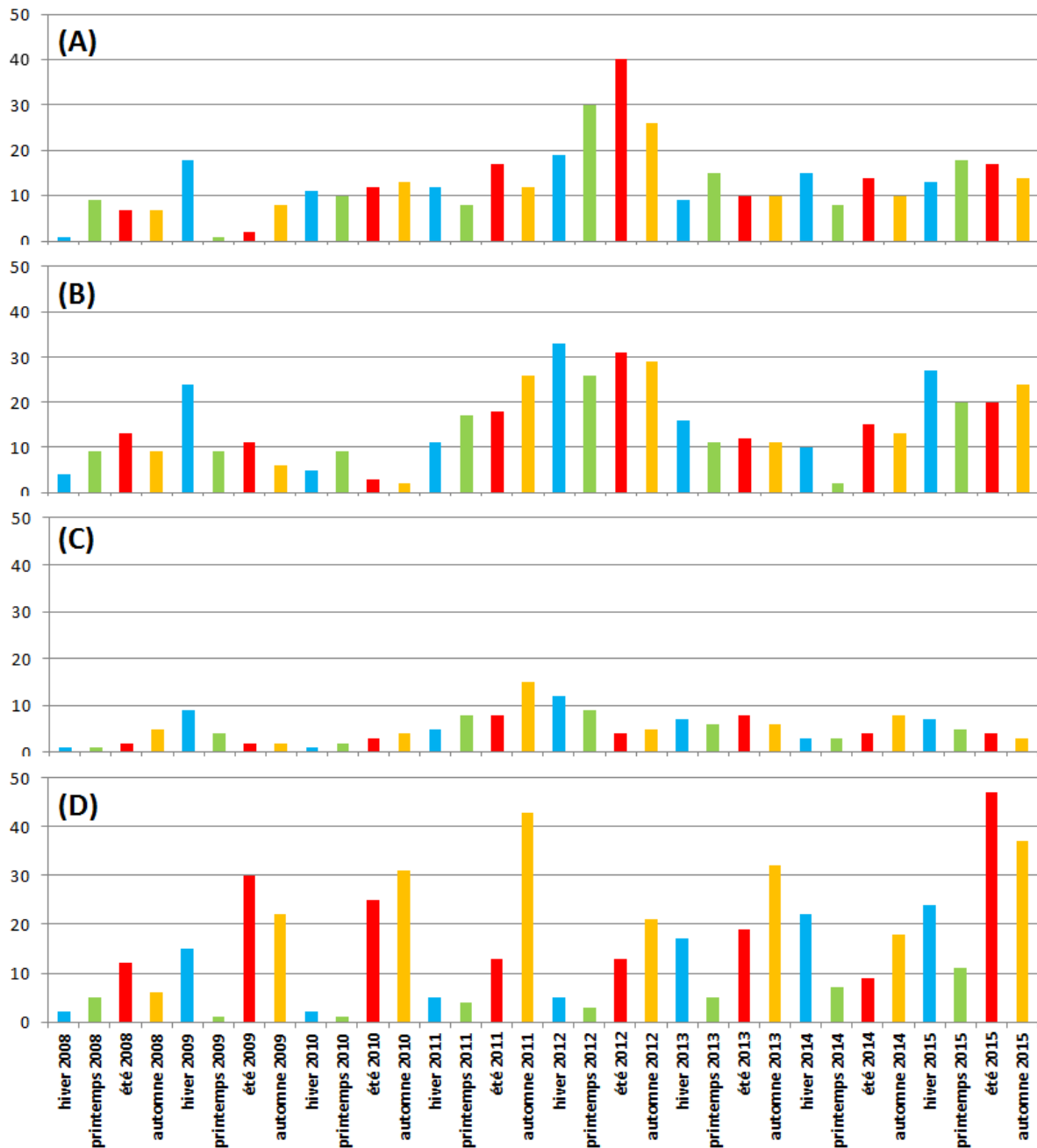


Figure 2. Distribution du nombre de *Salmonella* Mbandaka (A, n=416), *S. Montevideo* (B, n=476), *S. Typhimurium* (C, n=166) et *S. Dublin* (D, n=507) recensés, en fonction de la saison de réalisation des prélèvements à l'origine des isoléments, entre 2008 et 2015. [Données issues du réseau *Salmonella*, Anses. L'axe des ordonnées correspond au nombre d'isolats recensés selon le sérotype considéré].

3.2. Modélisation de la contamination des fromages morbier et mont d'or par *Salmonella* Dublin

3.2.1. Description des protocoles mis en place par les professionnels

Les syndicats interprofessionnels du morbier et du mont d'or ont mis en place un protocole d'autocontrôles microbiologiques des laits et des fromages applicables à tous les ateliers de fabrication de morbier et de mont d'or.

La version de la saison 2014/2015 de ce protocole est désignée ci-après par le terme de « protocole de référence ».

Suite à une hausse inhabituelle de la fréquence de contamination des laits par *Salmonella* Dublin et à la survenue d'une épidémie nationale entre novembre 2015 et avril 2016, des protocoles d'autocontrôles dits « renforcés » ont été mis en place au cours de l'année 2016 sur les fromages (en février 2016 avec modification en juin 2016) et les laits (août-septembre 2016). Ces protocoles dits renforcés sont toujours en application.

➤ **Modalités des autocontrôles de *Salmonella* spp. selon le protocole de référence des syndicats interprofessionnels de morbier et mont d'or**

○ Autocontrôles des laits

Le protocole de référence, appliqué lors de la saison 2014-2015 et jusqu'au mois de septembre 2016, pour les autocontrôles concernant *Salmonella* spp. dans les laits est commun aux filières morbier et mont d'or. Les laits des producteurs sont analysés au minimum trois fois par mois pour la recherche de *Salmonella* spp. Celle-ci est effectuée sur un échantillon de 25 mL de lait représentant un pool de producteurs (maximum quatre producteurs par pool). Le volume de lait prélevé pour chaque producteur est donc au minimum de 6,25 mL par producteur (en cas de pool de quatre) et d'un maximum de 25 mL pour un seul producteur (absence de pool). Le mélange des laits individuels est effectué par le laboratoire et des échantillons des laits individuels sont conservés afin d'être analysés séparément en cas de résultat non conforme du pool.

Certains ateliers analysent quotidiennement les laits de mélange (analyse du lait ou du filtre à lait).

En cas de résultat non conforme, le lait des producteurs du pool est écarté de la collecte pour les fabrications suivantes. En parallèle, les échantillons de lait correspondant à chacun des producteurs du pool sont analysés individuellement afin de retrouver le ou les producteurs en cause.

À la suite des analyses individuelles, plusieurs actions sont engagées :

- les laits conformes sont remis en production,
- le ou les producteurs identifiés non conformes sont écartés de la collecte,
- une intervention à la ferme est réalisée par un technicien pour rechercher l'origine de la contamination et mettre en place des actions correctives,
- le lait du ou des producteurs identifiés non conformes continue à être analysé trois fois par mois.

La remise en fabrication du lait du ou des producteurs écartés peut être faite dès le premier résultat conforme, bien qu'il soit recommandé par le syndicat d'attendre trois résultats conformes.

Par ailleurs, les fabrications réalisées à partir du pool de lait contaminé doivent être identifiées et :

- pour la fabrication de morbier, des analyses doivent être effectuées selon un protocole renforcé par rapport au protocole de référence d'autocontrôles sur fromages,
- pour la fabrication de mont d'or, des analyses supplémentaires peuvent éventuellement être réalisées sur ces fabrications.

Les modalités de ces analyses renforcées ou supplémentaires sur les fabrications issues de lait contaminé ne sont pas précisées dans les documents transmis à l'Anses.

○ Autocontrôles des fromages

Les autocontrôles sur les fromages sont réalisés suivant un protocole différent pour les filières morbier et mont d'or. Ils sont donc présentés séparément.

Le morbier

Le protocole d'autocontrôles microbiologiques est basé sur la définition d'un lot de fromages. En filière morbier, un lot est défini par un ensemble homogène de matière première mis en œuvre, c'est-à-dire les « mêmes producteurs mis en fabrication chaque jour », et ne peut pas excéder cinq jours de fabrication sur une semaine et 400 meules (la masse d'une meule varie entre 5 et 8 kg). Autrement dit, un lot regroupe les fromages fabriqués à partir de laits issus d'un même groupe de producteurs, sur 5 journées de fabrication maximum dans une semaine et dans la limite de 400 meules. Il est à noter qu'une journée de fabrication ne doit pas être affectée à deux lots différents. Dans le cas d'une

production fermière, en raison du faible volume fabriqué, un lot est défini par la fabrication d'un mois maximum.

Tous les lots doivent être analysés pour la recherche de *Salmonella* spp. au stade affinage à partir de J+25.

Les prélèvements sont effectués sur :

- un fromage pour les lots de petite taille (≤ 40 fromages),
- cinq fromages pour les lots de plus de 40 fromages,
- deux fromages pour les lots de productions fermières.

Lorsqu'un lot regroupe plusieurs journées de fabrication, les prélèvements doivent être effectués sur des fromages de chaque journée. La recherche de salmonelles est réalisée sur un échantillon composite de 25 g dans le cas des lots de plus de 40 fromages ou des lots fermiers et à partir d'un seul fromage dans les autres cas. La prise d'essai est composée de 20% de croûte et de 80% de pâte.

En cas de résultat non conforme pour un lot constitué d'une seule journée de fabrication, le lot est détruit.

En cas de résultat non conforme sur un lot regroupant plusieurs journées de fabrication clairement identifiées et pouvant être ré-analysées individuellement, seule la fabrication de la ou les journées non conformes doit être détruite (suivant les directives des services vétérinaires).

D'autre part, des analyses suivant un protocole renforcé doivent être effectuées sur les trois jours de fabrication encadrant le lot positif (J-3 et J+3). Les modalités du protocole renforcé ne sont pas définies dans les documents transmis à l'Anses. La source de contamination doit être recherchée et des actions correctives mises en place.

Le mont d'or

En fabrication mont d'or, le lot est défini comme étant l'ensemble des fromages issus de la même journée de fabrication.

Tous les lots doivent être analysés pour la recherche de *Salmonella* spp. au stade affinage entre J+13 et J+16. Les prélèvements sont effectués sur cinq fromages d'un lot et la recherche de salmonelles est réalisée sur un échantillon composite (5 x 5 g) de 25 g.

En cas de résultat non conforme, le lot est détruit et d'éventuelles analyses complémentaires sont effectuées en fonction du plan de contrôle de l'entreprise.

Au regard de ce manque d'information, et plus encore en l'absence d'une évaluation des réelles capacités de ces analyses supplémentaires ou renforcées à confirmer la maîtrise du risque *Salmonella* Dublin dans ces matrices, il ne peut être raisonnablement exclu que ces fromages, en particulier, soient des vecteurs de la bactérie jusqu'au consommateur.

➤ **Modalités des autocontrôles de *Salmonella* spp. selon le protocole renforcé en 2016, devenu protocole de routine en 2017**

○ Autocontrôles renforcés des laits

Depuis le mois d'août 2016 pour la filière mont d'or, et le mois de septembre 2016 pour la filière morbier, un renforcement des analyses dans le lait a été mis en place par rapport au protocole de référence décrit au paragraphe 3.2.1.

Il est recommandé par les syndicats d'abandonner les analyses par pool de producteurs et de les remplacer par des analyses individuelles à la fréquence minimale de trois analyses par mois.

Cependant, d'autres options peuvent être mises en place par un atelier de fabrication.

Dans le cas où l'atelier analyse quotidiennement les laits de mélange mis en œuvre (analyse du lait ou du filtre à lait), l'analyse individuelle des laits de producteurs n'est pas obligatoire. Cependant l'analyse par pool de maximum quatre producteurs trois fois/mois reste nécessaire ainsi que la recherche individuelle en cas de résultat non conforme du pool.

La gestion d'un résultat non conforme de la matière première (lait) diffère si l'analyse a été réalisée sur lait ou sur un filtre à lait.

- Si la non-conformité vient d'une analyse du lait (individuel ou mélange) alors le lot (ou la journée de fabrication en cause si elle est identifiée) fabriqué à partir de ce lait doit être détruit.
- Si la non-conformité est détectée par une analyse du filtre à lait (citerne ou tank) et que la recherche dans les laits individuels est négative, alors le lot doit faire l'objet d'un contrôle renforcé selon le protocole de la DGAI (30 prélèvements pour 6 analyses) *a minima*.

○ Autocontrôles renforcés des fromages

En février 2016, il a été décidé que tous les ateliers de fabrication de morbier et de mont d'or devaient appliquer au sens strict le règlement (CE) n°2073/2005 en réalisant cinq analyses de 25 g (n=5) par lot et non un seul échantillon composite (n=1). Ces analyses sont réalisées sur 100% des lots. En cas de lot non-conforme, trois actions sont mises en place :

- destruction du lot non conforme,
- nouvelle analyse (en n=5) de la fabrication de la journée précédente,
- analyse des trois journées de fabrication suivantes selon le protocole de prélèvement de la DGAI : six analyses à partir de 30 prélèvements (six composites de 25 g).

Depuis janvier 2017, le plan appliqué en routine (sur laits et fromages) correspond au plan dit « renforcé », c'est-à-dire l'analyse individuelle de laits de producteurs trois fois par mois (n=1*25mL) et de fromages (n=5*25g), excepté pour les ateliers présentant un historique de 3 mois d'analyses (lait, fromage, coproduits et environnement) montrant une absence de salmonelles.

3.2.2. Bilan des données d'autocontrôles dans les laits et les fromages transmises par les professionnels

➤ **Analyses réalisées dans les laits de producteurs**

L'ensemble des données individuelles d'autocontrôles de 2011 à 2017 pour *Salmonella* spp. et coliformes totaux dans les laits de producteurs (et non dans les laits de mélange) ont été transmis à l'Anses par les syndicats interprofessionnels AOP Morbier - Mont d'Or :

- 252 957 analyses ont porté sur la détection des salmonelles
- 238 775 analyses ont porté sur la quantification des coliformes totaux.

Ces analyses concernent uniquement les producteurs habilités pour les AOP morbier et/ou mont d'or. Le nombre d'analyses est le plus élevé pour l'année 2014 (74 388 analyses pour *Salmonella* spp.), année de la mise en place du protocole de référence, baisse en 2015 puis ré-augmente en 2016, année de la mise en place du protocole renforcé dans les laits (en août 2016)

Les résultats transmis pour 2017 ne concernant que quelques mois du début de l'année 2017 n'ont pas été intégrés dans l'analyse descriptive qui suit.

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les pourcentages annuels d'analyses positives pour *Salmonella* spp. entre les différentes années (2011 à 2016) (figure 3). Toutes années et toutes saisons confondues, la moyenne d'échantillons de lait de producteurs positifs pour *Salmonella* spp. est de 0,13%.

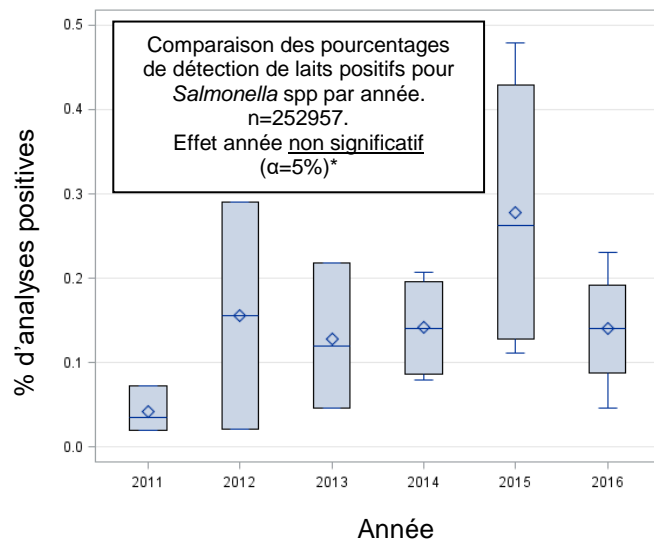


Figure 3. Evolution des détections de laits positifs entre 2011 et 2016. La moyenne est représentée par un losange, la médiane est indiquée par la ligne située dans la boîte, les extrémités de la boîte représentent les 1^{er} (extrémité inférieure) et 3^{ème} quartiles (extrémité supérieure) *Régression logistique avec le logiciel SAS®

Concernant l'évolution saisonnière de la contamination des laits par *Salmonella* spp. : il n'y pas d'effet statistiquement significatif de la saison sur le pourcentage d'analyses positives pour *Salmonella* spp. et ce, de façon générale et en comparant les saisons deux à deux (figure 4) (seuil significatif à 5%).

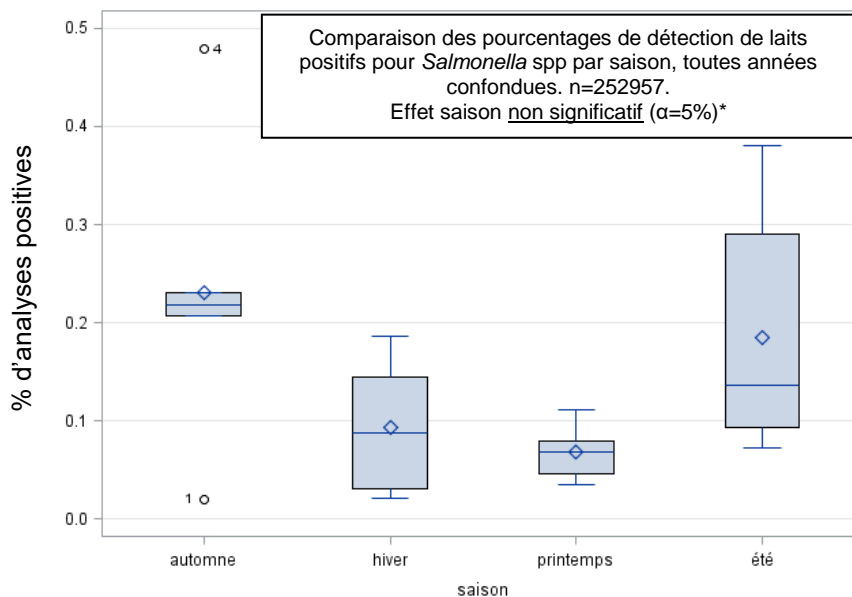


Figure 4. Distribution des pourcentages d'analyses positives pour *Salmonella* spp. dans les laits de producteurs par saison pour la période 2011-2016. La moyenne est représentée par un losange, la médiane est indiquée par la ligne située dans la boîte, les extrémités de la boîte représentent les 1^{er} (extrémité inférieure) et 3^{ème} quartiles (extrémité supérieure). *Régression logistique avec le logiciel SAS®

➤ Analyses réalisées dans les fromages

Au total, 38 534 résultats d'autocontrôles de détection de *Salmonella* spp. dans les fromages effectués entre 2011 et 2017 ont été transmis par les syndicats interprofessionnels AOP Morbier – Mont d'Or :

- 23 720 analyses ont porté sur la détection des salmonelles dans les morbiers (dont 501 dans les morbiers pré affinés (analyses à partir de 2016) et 23 219 dans les morbiers pendant l'affinage),
- 14 814 analyses ont porté sur la détection des salmonelles dans les monts d'or.

Ces analyses sont réalisées soit dans le cadre des autocontrôles en routine (dans 96,64% des cas), soit dans le cadre de vérifications (0,09% des cas) ou encore dans le cadre d'analyses renforcées des lots encadrants un lot détecté positif (3,27% des cas).

L'analyse descriptive qui suit prend uniquement en compte les résultats d'analyses issues de contrôles de routine (autocontrôles) pour les années 2011 à 2016 (34773 analyses).

Le nombre annuel d'analyses entre 2012 et 2015 est stable, entre 2025 et 2700 analyses par an sur les deux matrices morbier (affiné) et mont d'or (à noter qu'aucune analyse sur morbier pré affiné n'est faite avant 2016).

En 2016, suite la mise en place du protocole renforcé tel que décrit précédemment, le nombre d'analyses sur les deux types de fromages augmente fortement (figure 5).

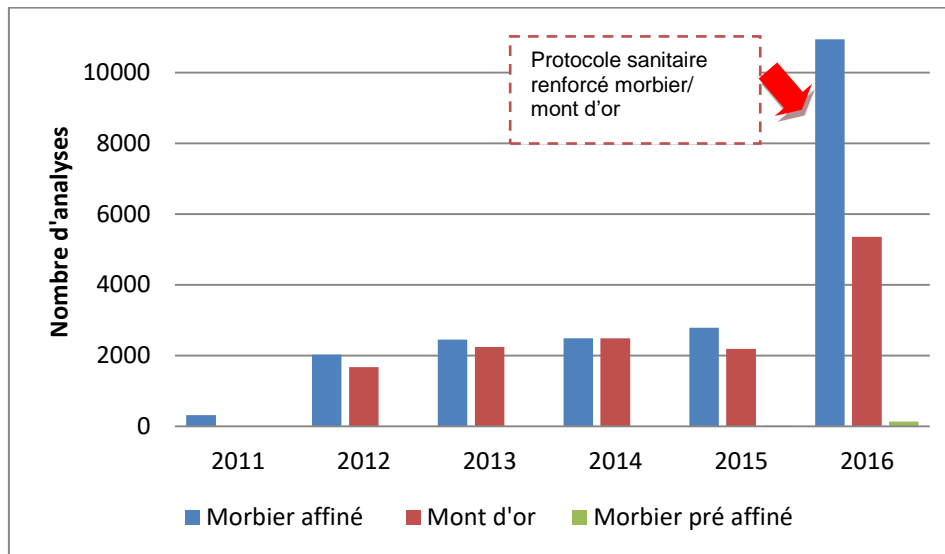


Figure 5. Evolution du nombre d'analyses effectuées en routine pour la détection de *Salmonella* spp. dans les fromages morbier et mont d'or entre 2011 et 2016

Le pourcentage de lots détectés positifs à *Salmonella* spp. par saison et par an entre 2011 et 2016 est présenté figure 6 pour les fromages mont d'or (analysés à J13-J16), morbier (analysés à J25) et morbier pré-affinés (analysés avant affinage).

La saison n'influence pas de manière statistiquement significative le nombre de fromages positifs détectés (effet saison non statistiquement significatif (seuil de significativité à 5%) pour chaque matrice et toutes années confondues).

De façon générale, toutes années et toutes saisons confondues, les moyennes d'échantillons de fromages positifs pour *Salmonella* spp. pour le morbier affiné et le mont d'or sont respectivement de 0,4% et 0,6%.

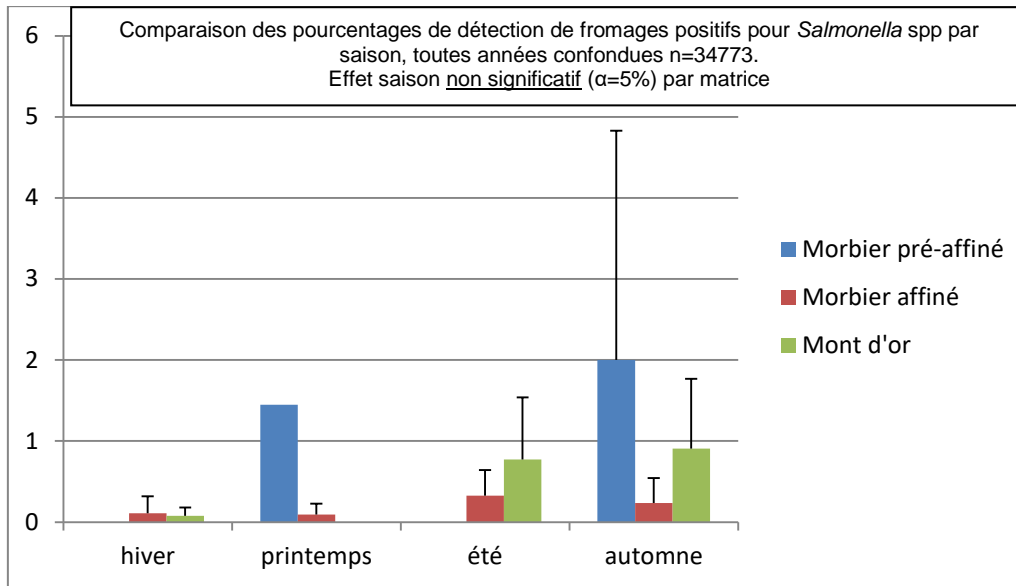


Figure 6. Histogramme des moyennes (et écart type) des pourcentages de fromages positifs pour *Salmonella* spp. par saison entre 2011 et 2016. *Régression logistique par matrice avec le logiciel SAS®

Les laits et fromages morbier et mont d'or font l'objet d'un nombre important d'analyses en autocontrôle, opérées par les professionnels. Aucune variation saisonnière statistiquement significative n'est détectée que ce soit dans les laits de producteurs ou les deux types de fromage.

3.2.3. Données de surveillance publique en filière

Le tableau 1 résume les résultats du plan de surveillance de la contamination des fromages au lait cru par *Salmonella* spp. mis en œuvre en 2016 par la DGAI. Le taux de contamination des fromages au lait cru par *Salmonella* spp. observé est faible (inférieur à 1%).

Tableau 1. Bilan des résultats du plan de surveillance de la contamination des fromages au lait cru par *Salmonella* spp. mis en œuvre en 2016 par la DGAI.

Intitulé du plan	Année	Matrices d'intérêt	Stade surveillé	Nombre de prélèvements avec présence de <i>Salmonella</i> / nombre de prélèvements réalisés (%)		Sérotype concerné si connu
« Contamination des fromages au lait cru par <i>Listeria monocytogenes</i> et par <i>Salmonella</i> spp. au stade de la production »	2016	Fromages au lait cru hors pâtes pressées cuites	Production	Vache – pâtes pressées non cuite	1/169 (0,6%)	<i>Salmonella</i> Virchow
				Vache – pâtes molles	1/113 (0,9%)	<i>Salmonella</i> Typhimurium

Ces résultats sont concordants avec les résultats des autocontrôles : contamination en fin de production inférieure à 1%. A noter qu'un nouveau plan visant à surveiller la contamination des fromages au lait cru par *Salmonella* spp., également au stade de la production est en cours.

3.2.4. Modélisation de la contamination des fromages morbier et mont d'or par *Salmonella* Dublin pour l'évaluation de l'efficacité des protocoles d'échantillonnage

Le modèle développé dans cet avis simule les différentes étapes de la fabrication du morbier depuis la collecte du lait jusqu'à la consommation des fromages (figure 7). L'objectif de la modélisation est d'estimer et comparer l'efficacité de différents plans d'échantillonnage sur la réduction du risque de salmonelloses liés à la consommation de l'un des deux types de fromages.

Le modèle est basé sur le postulat que, les lots détectés positifs pour salmonelles n'étant pas mis sur le marché, ils ne seront donc pas consommés, ce qui réduit l'exposition des consommateurs de morbier et de mont d'or, et *in fine* le risque.

NB: les données nécessaires à la modélisation de la fabrication du mont d'or étant jugées insuffisantes, seules les étapes de la fabrication du morbier ont été modélisées. En effet, la non disponibilité de certaines valeurs de paramètres physico-chimiques à plusieurs étapes représente pour cette étude une source trop importante d'incertitude pour permettre une modélisation rigoureuse de la fabrication du mont d'or. L'ensemble des paramètres physico-chimiques spécifiques du morbier a été transmis par les professionnels.

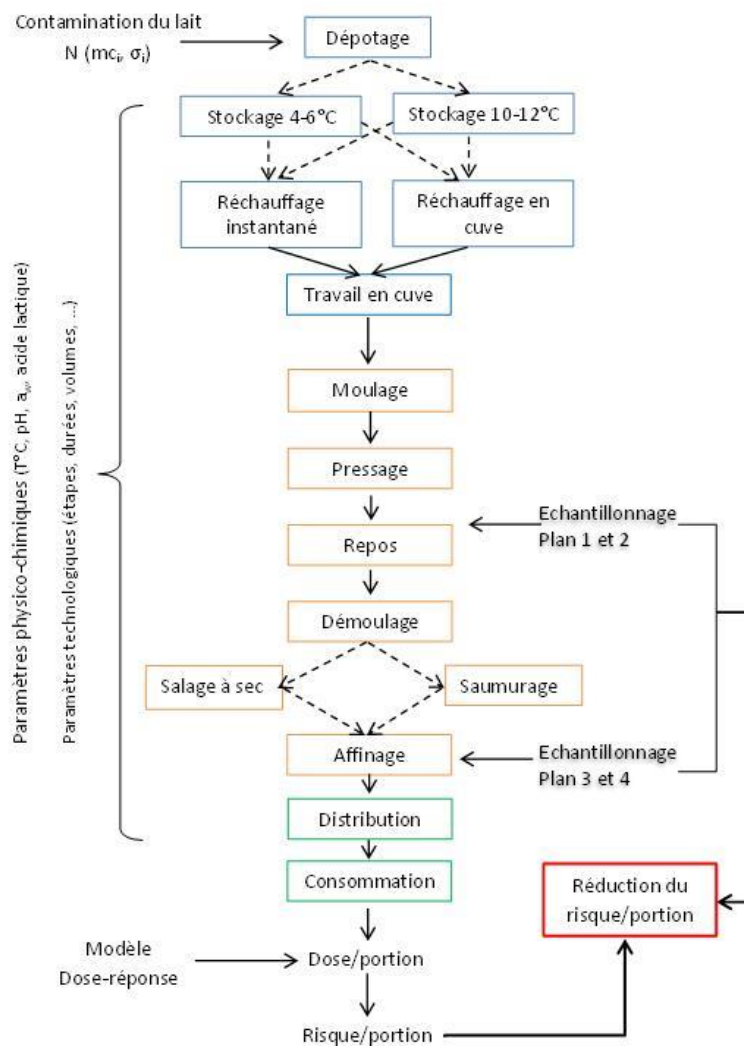


Figure 7 : Structure générale du modèle de la contamination des fromages morbier par *Salmonella* Dublin

a) Modélisation du comportement de *Salmonella* spp. dans la matrice

La croissance des salmonelles dans le lait et les fromages au cours des étapes de transformation, affinage et conservation est simulée en fonction des paramètres physico-chimiques du produit (température, pH, activité de l'eau (aw) et concentration en acide lactique sous sa forme non-dissociée) par des modèles de microbiologie prévisionnelle (Rosso *et al.*, 1995 ; Augustin *et al.*, 2005) présentés en Annexe 2.

Les paramètres cardinaux utilisés pour le modèle secondaire de croissance (Tableau 2) sont issus des travaux de Coroller *et al.* (2015). Ces paramètres correspondent aux conditions limites et optimales de croissance des salmonelles en milieu de culture.

Tableau 2 : Paramètres cardinaux de croissance des salmonelles et concentration minimale inhibitrice d'acide lactique non-dissocié (Coroller *et al.*, 2015)

T _{min} (°C)	T _{opt} (°C)	T _{max} (°C)	pH _{min}	pH _{opt}	pH _{max}	aw _{min}	aw _{opt}	CMI _{lac} (mmol/L)
5,06	39,3	46,48	3,58	7,0	10,42	0,951	0,999	6,13 (α=2)

Le taux de croissance optimal (μ_{opt}) est un paramètre du modèle secondaire de croissance qui, contrairement aux paramètres cardinaux, est spécifique du couple bactérie/matrice. Il est généralement estimé à partir de courbes de croissance de la bactérie dans la matrice étudiée. En l'absence de telles données disponibles (publiées ou transmises par le syndicat) il n'est pas possible d'estimer la valeur de ce paramètre pour le couple *Salmonella*-morbier ou *Salmonella*-mont d'or. Au regard des valeurs de taux de croissance optimal issues de la littérature pour des bactéries pathogènes dans le lait ou des fromages français (Tableau 3) et pour tenir compte de l'incertitude concernant le couple *Salmonella*-morbier, trois valeurs de μ_{opt} sont utilisées dans le modèle : 0,5, 1,0 et 2,0 h⁻¹.

Tableau 3 : Taux de croissance optimaux ou taux de croissance de référence à température optimale, issus de la littérature pour différents pathogènes dans des matrices lait ou fromage

Pathogène	Matrice	Estimation	Référence
<i>E. coli</i> entéro-hémorragiques (TOP-5)	Fromage à pâte molle au lait cru	1,85	Perrin <i>et al.</i> , 2015
<i>L. monocytogenes</i>	Fromage à pâte molle au lait pasteurisé	1,20	Schvartzman <i>et al.</i> , 2011
<i>Salmonella diarizonae</i>	Lait cru (brebis)	0,80	Perrin, 2013
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Lait pasteurisé (vache)	1,36	Fares, 2007
<i>Salmonella</i> Montevideo	Lait pasteurisé (vache)	1,39	Fares, 2007

Lors de l'affinage de certains types de fromage, il peut être observé une inactivation de la population de bactéries pathogènes présentes (Chatelard-Chauvin *et al.*, 2015; Miszczycha *et al.*, 2013, Perrin 2013). Le modèle d'inactivation athermique développé par Coroller *et al.*, (2015) permet de simuler cette inactivation, de la même façon que la croissance, en fonction des paramètres physico-chimiques de la matrice (température, pH, activité de l'eau, concentration en acide lactique).

L'inactivation de *S. Dublin* dans un fromage à pâte pressée non cuite de type saint-nectaire, fabriqué à partir de lait artificiellement contaminé, a été décrite lors d'une étude menée par la DGAI et le Pôle Fromager AOP Massif central. Cette diminution est estimée à 0,033 log₁₀ UFC/jour soit une diminution de 1,5 log₁₀ UFC au bout de 45 jours d'affinage.

En l'absence de cinétiques de suivi de population de salmonelles dans les fromages de type morbier, aucun élément ne permet de déterminer si la concentration en *Salmonella* spp. diminue lors de l'affinage de ces fromages ni de modéliser cette inactivation. Ainsi, deux hypothèses de comportement des salmonelles dans le morbier sont modélisées :

- la première (H1) considère qu'il n'y a pas d'inactivation des salmonelles lors de l'affinage des fromages, ni pendant la phase de conservation/consommation ;
- la seconde (H2), basée sur des cinétiques d'évolution de la concentration en salmonelles dans des fromages de type saint-nectaire, considère une diminution de la concentration lors de l'affinage.

Pour ce scénario, la concentration en salmonelles dans les fromages est supposée stable entre la sortie d'affinage et la consommation.

b) Contamination du lait : paramètres et hypothèses

La contamination des fromages par *Salmonella* spp. est supposée provenir d'une contamination du lait lors de la traite. La possibilité de recontamination pendant la transformation ou l'affinage des fromages ainsi que les contaminations croisées sont supposées négligeables et ne sont pas prises en compte dans ce modèle.

Il est à noter que le modèle ne prend pas en compte la mise en place éventuelle d'actions correctives suite à des analyses positives sur les laits de producteurs.

En l'absence de données permettant de caractériser la distribution des niveaux de concentrations dans les laits de producteurs ou de mélange, différents niveaux de concentration initiale du lait de tank (mc_i) sont testés :

- $mc_i=10^{-5}$ UFC/ml,
- $mc_i=10^{-4}$ UFC/mL,
- $mc_i=10^{-3}$ UFC/mL.

En l'absence d'identification d'un effet saison sur la prévalence de contamination des laits de producteurs et des fromages, aucun pic de saisonnalité n'est modélisé. La prévalence de tanks contaminés ne peut être estimée à partir des résultats dans les laits de producteurs en raison de l'absence de données relatives à la composition des collectes et aux volumes collectés. L'objectif du modèle étant d'évaluer l'efficacité des plans d'échantillonnage, seuls les lots contaminés sont donc modélisés.

c) Paramètres physico-chimiques et scénarios de fabrication

Les étapes de transformation depuis le stockage du lait jusqu'à l'affinage sont simulées sur la base des paramètres technologiques et physico-chimiques transmis par le Syndicat Interprofessionnel AOP Morbier - Mont d'Or.

Pour chaque étape de transformation, les valeurs minimales et maximales des paramètres ainsi que les valeurs modales (les plus fréquentes) ont été transmises par le syndicat pour tenir compte de la variabilité des pratiques entre les ateliers.

Le modèle simule la fabrication de 5000 lots de fromages avec l'hypothèse faite qu'un lot représente l'ensemble des fromages fabriqués à partir d'un tank de grand mélange pour une journée de fabrication. Pour chaque itération, le volume V_i du tank servant à la fabrication du lot i est tiré au sort dans une distribution triangulaire de paramètre V_{min} , V_{mod} , V_{max} représentant respectivement la valeur minimale, modale et maximale du volume du tank. Celles-ci sont fixées respectivement à 1750 L, 2360 L et 5900 L correspondant ainsi à des lots de j fromages avec j compris entre 20 et 100 et un mode de 40 fromages (volume de lait par fromage = 59 L).

Les paramètres physico-chimiques renseignés à chaque étape sont la température, le pH, l'activité de l'eau (a_w) ainsi que les teneurs en acide lactique lors de l'acidification et de l'affinage des fromages. Pour chacun des lots simulés, les paramètres sont tirés au sort dans une distribution triangulaire, utilisant les valeurs minimales, modales et maximales, ou uniforme entre la valeur minimale et la valeur maximale, lorsque le mode n'est pas connu. Les valeurs de pH, a_w et acide lactique varient également entre les fromages d'un même lot. Par ailleurs, les valeurs de pH et d' a_w évoluent de manière différente entre la pâte et la croûte des fromages. Cette distinction est prise en compte par le modèle à partir de l'entrée en cave d'affinage en considérant 10% de croûte pour 90% de pâte.

Afin de tenir compte de la variabilité des pratiques entre les ateliers de fabrication, plusieurs options de transformation sont modélisées pour les étapes de stockage du lait, réchauffage du lait et salage des fromages. Ces options sont résumées dans le tableau 4.

Lors de l'égouttage des fromages et du soutirage du lactosérum, le modèle considère que 10% des bactéries présentes dans le caillé sont éliminées avec le lactosérum (estimation par dire d'experts).

Dans le lait, les bactéries sont en suspension et donc supposées réparties de façon homogène. En revanche, dans les caillés moulés, les bactéries sont supposées être figées dans la matrice et si elles se multiplient forment des colonies. En cas de croissance dans le caillé moulé et le fromage, c'est donc la taille des colonies qui augmente et non leur nombre. En cas d'inactivation lors de l'affinage, la décroissance est appliquée aux colonies. La concentration d'un fromage C_{ij} en salmonelles est obtenue en multipliant le nombre de colonies d'un fromage (N_{ij}) par la taille des colonies (S_{ij}) (c'est-à-dire le nombre de bactéries par colonie) en UFC/g.

Tableau 4 : Options de fabrication modélisées

Étape	Option 1	Option 2
Stockage du lait	Entre 4°C et 6°C	Entre 10°C et 12°C
Réchauffage du lait	Instantané 1 à 3 minutes	En cuve 15 à 30 minutes
Salage	Salage à sec 16 heures, pH entre 5,32 et 5,40	Saumurage 2 à 7 heures, pH entre 5,26 et 5,38

La durée d'affinage varie entre 45 et 120 jours suivant les lots. En sortie d'affinage, les étapes de distribution et de stockage chez le consommateur sont simulées en faisant l'hypothèse que les paramètres physico-chimiques intrinsèques du produit (pH, a_w et concentration en acide lactique) restent constants et que la température est comprise entre 4°C et 8°C jusqu'à consommation à 60 jours.

d) Calcul des probabilités de détection

La probabilité de détection $P(Dm_{ij})$ de la présence de *Salmonella* spp. dans un échantillon de masse m (en g) d'un fromage j de poids p suit une loi de Poisson de paramètre λ_{ij} représentant le nombre moyen de colonies de salmonelles dans l'échantillon soit $\lambda_{ij} = N_{ij} \times m/p$ avec N_{ij} le nombre de colonies estimé dans le fromage j du lot i à l'étape du prélèvement.

La spécificité et la sensibilité de la méthode analytique simulée sont supposées égales à 100%.

La probabilité de détection de la présence de salmonelles dans au moins un échantillon de m g parmi n échantillons prélevés $P(Dn)$ est obtenue par :

$$P(Dn) = 1 - (1 - (P(Dm_{ij})))^n$$

Avec $m = 5$ ou 25 g, et en considérant un échantillon composé à 90% de pâte et 10% de croûte.

e) Estimation du risque de salmonellose par portion

La taille de portion de morbier est estimée à 45,5 g en moyenne, à partir des données de tailles de portions issues de l'enquête INCA3 (Anses, 2017), présentées dans le tableau.

Le modèle estime le risque de salmonellose lié à la consommation d'une portion de 45,5 g de fromage fabriqué à partir de lait contaminé. Il s'agit du risque de référence, noté **Rref**.

Tableau 5 : Distribution de la taille de portion (en g) de morbier chez les seuls consommateurs adultes de 18 à 79 ans (p5= 5^{ème} centile, p95=95^{ème} centile).

Matrice	Nombre de consommations	Moyenne (g)	[IC 95%]	Min	p5	Médiane	p95	Max
Morbier	68	45,5	[41,9-49,0]	20	20	39	61	84

Source Inca3 (2014-2015), traitement Anses

Pour chaque fromage j d'un lot i simulé à partir de lait contaminé, la quantité de salmonelles dans une portion de 45,5 g est estimée au moment de la consommation. Les fromages étant considérés consommés en l'état (pas de cuisson), cette quantité de bactérie représente la dose ingérée. La probabilité d'infection par les salmonelles associée à la consommation d'une portion de fromage $Pinf_{ij}$ est obtenue en appliquant le modèle de dose-réponse de Teunis *et al.* (2010).

Le risque de référence Rref est ici la moyenne des probabilités $Pinf_{ij}$ de salmonellose suite à la consommation d'une portion de fromage provenant d'un lot quelconque fabriqué à partir de lait contaminé.

Sous chacune des deux hypothèses sur le comportement des salmonelles dans la matrice (H1 : pas d'inactivation en affinage ; H2 : inactivation en affinage) et pour chacune des combinaisons d'options de fabrication (stockage du lait, réchauffage du lait, salage), le risque Rref associé à un scénario de contamination et de μ_{opt} est estimé : soit un total de 144 valeurs de risques de référence estimées. En fonction du niveau de contamination du produit fini au moment de la consommation, ce risque de référence est plus ou moins élevé.

f) Plans d'échantillonnage évalués

Les plans d'échantillonnage évalués dans cet avis sont présentés dans le tableau 6. Le plan 1 et le plan 2 correspondent aux plans mis en place au sein de la filière morbier sur les fromages (plan de référence et plan renforcé). Les plans 3 et 4 sont hypothétiques et visent à apprécier l'impact du stade de prélèvement sur l'efficacité de l'échantillonnage.

Tableau 6 : Plans d'échantillonnage simulés [* =pas d'inactivation pendant l'affinage ;** =inactivation pendant l'affinage]

Dénomination plan	Hypothèse	Etape de prélèvement	Nombre et taille des prélèvements	Conditions d'application
Plan 1-H1	H1*	Au pic de concentration	n=1 x 25g n=5 x 5g	Lots < 40 fromages Lots ≥ 40 fromages
Plan 2-H1	H1*	Au pic de concentration	n=5 x 25g	100% des lots
Plan 3-H1	H1*	J25	n=1 x 25g n=5 x 5g	Lots < 40 fromages Lots ≥ 40 fromages
Plan 4-H1	H1*	J25	n=5 x 25g	100% des lots
Plan 1-H2	H2**	Au pic de concentration	n=1 x 25g n=5 x 5g	Lots < 40 fromages Lots ≥ 40 fromages
Plan 2-H2	H2**	Au pic de concentration	n=5 x 25g	100% des lots
Plan 3-H2	H2**	J25	n=1 x 25g n=5 x 5g	Lots < 40 fromages Lots ≥ 40 fromages
Plan 4-H2	H2**	J25	n=5 x 25g	100% des lots

3.2.5. Résultats du modèle

Pour rappel, le risque de référence Rref est estimé sous deux hypothèses concernant le comportement des salmonelles dans le fromage de type morbier :

- H1 considère qu'il n'y a pas d'inactivation des salmonelles lors de l'affinage des fromages et conduit à l'estimation du risque Rref_{H1} ;
- H2, basée sur des cinétiques d'évolution de la concentration en salmonelles dans des fromages de type saint-nectaire fabriqués à partir de lait artificiellement contaminé, considère une diminution de la concentration lors de l'affinage. Sous cette hypothèse, le risque de référence Rref_{H2} est inférieur au risque Rref_{H1}.

L'efficacité des quatre plans d'échantillonnage est comparée en termes de pourcentage de réduction du risque de salmonellose par portion de 45,5 g de morbier par rapport au risque de référence Rref.

Ces plans d'échantillonnage sont testés pour neuf scénarios combinant une valeur de contamination initiale et une valeur de taux croissance optimal décrits dans le tableau 7.

Tableau 7. Scenarios de contamination et de taux de croissance optimal

Scenario	Contamination initiale dans le lait de mélange (UFC/mL)	μ _{opt} (taux de croissance optimal) dans le lait (= μ _{opt} fromage) (h ⁻¹)
SC1	10 ⁻⁵	0,5
SC2	10 ⁻⁴	0,5
SC3	10 ⁻³	0,5
SC4	10 ⁻⁵	1
SC5	10 ⁻⁴	1
SC6	10 ⁻³	1
SC7	10 ⁻⁵	2
SC8	10 ⁻⁴	2
SC9	10 ⁻³	2

De plus, pour rappel, afin de tenir compte de la variabilité des pratiques entre les ateliers de fabrication, plusieurs **options de transformation** ont été modélisées pour les étapes de stockage du lait, réchauffage du lait et salage/saumurage des fromages (tableau 4).

Pour chaque combinaison [hypothèse-scénario-option de fabrication] un risque de référence et le pourcentage de réduction de celui-ci par l'application d'un plan d'échantillonnage (et donc non commercialisation des lots contaminés) sont estimés.

NB : l'ensemble des résultats présentés ci-après sont spécifiques des hypothèses et des paramètres d'entrée du modèle.

a) Analyse des options de transformation

Quel que soit le scénario de contamination initiale / taux de croissance optimal considéré, les résultats de simulation montrent que la croissance des salmonelles est impactée par la température de stockage du lait (options 1 : entre 4°C et 6°C ; option 2 : entre 10 et 12 °C). En effet, s'il n'y a pas de croissance simulée dans le cas d'un lait stocké entre 4-6°C, au contraire, une croissance de 0,2 à 1 log₁₀ UFC/g, en fonction du μ_{opt} considéré, est simulée dans les laits stockés à 10-12°C.

La figure 8 permet d'illustrer, pour exemple, la croissance des salmonelles pour un stockage du lait entre 10 et 12°C : la comparaison des évolutions de concentrations entre l'étape 1 et 3 (c'est-à-dire le stockage du lait) pour le scénario 5 ($m_{ci}=10^{-4}$ UFC/mL et $\mu_{opt}=1$) illustre bien une croissance d'environ 0,5 log pendant le stockage du lait à 10-12°C (stagnation de la contamination dans le cas d'un stockage entre 4 et 6°C).

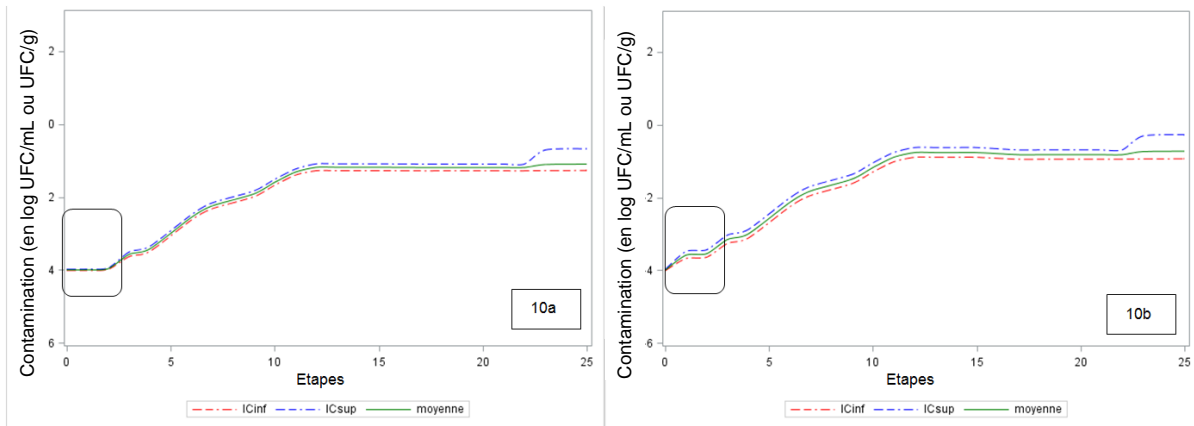


Figure 8. Evolution de la concentration du stockage à l'affinage en log UFC/mL ou UFC/g selon l'étape (IC Inf et IC Sup : intervalle de confiance borne inférieure et supérieure (IC à 90%)) en fonction de l'étape de fabrication et de la température de stockage (10.a : stockage du lait entre 4 et 6°C ; 10.b : stockage du lait entre 10 et 12°C). L'étape de stockage est signalée grâce à un encadré pointillé sur les graphiques. Etape 1=stockage, étape 2=réchauffage, étape 7=moulage, étape 13=fin d'acidification, étape 15=pressage, étape 16=entrée affinage, étape 20= J25, étape 22=J45, étape 23=fin d'affinage, étape 25= Date de Durabilité Minimale

D'autre part, la croissance simulée à l'étape de chauffage n'est pas différente en fonction de l'option de réchauffage modélisée (en cuve ou instantanée).

Enfin, les résultats des simulations montrent une inhibition de la croissance lors de la phase d'acidification pour les taux d'acide lactique mesurés, et ce quelle que soit l'option de salage modélisée : salage à sec ou saumurage. Les deux options ne sont donc pas distinguées ci-dessous.

Ainsi, seules les options 1 et 2 pour l'étape de stockage sont considérées :

OPT1 : T°C de stockage du lait = 4-6°C ;

OPT2 : T°C de stockage du lait = 10-12°C.

Quel que soit le scénario étudié, l'option 2 (stockage du lait à 10-12°C) conduit à un risque de référence plus élevé que le risque de référence estimé avec l'option 1, la dose ingérée étant plus élevée. Le facteur d'augmentation du risque de référence estimé avec l'option 2 par rapport à celui estimé avec l'option 1 est présenté par scénario et hypothèse dans le tableau 8.

Tableau 8 : Rapport entre le risque de référence estimé pour l'option de fabrication 2 (température de stockage du lait 10-12°C) par rapport au risque de référence estimé pour l'option de fabrication 1 (température de stockage du lait 4-6°C). SC = scénario (voir détail dans le tableau 7)

Rapport = Rref(OPT2)/Rref(OPT1)									
	SC1	SC2	SC3	SC4	SC5	SC6	SC7	SC8	SC9
Hypothèse H1 (pas d'inactivation pendant l'affinage)	1,5	1,4	1,3	2,0	1,6	1,3	1,6	1,3	1,3
Hypothèse H2 (diminution de la concentration pendant l'affinage)	1,6	1,6	1,6	2,6	2,6	2,5	5,7	5,7	5,7

NB : le pourcentage de réduction du risque associé à un plan d'échantillonnage est estimé par rapport à un risque de référence donné. Le risque de référence n'étant pas équivalent entre l'option 1 et l'option 2, la comparaison de l'efficacité d'un plan entre option de fabrication 1 et 2 ne doit pas être effectuée. En effet, en aucun cas une réduction du risque plus importante associée à un plan d'échantillonnage avec l'option 2 (température de stockage du lait 10-12°C), par rapport à l'option 1 (température de stockage du lait 4-6°C), ne suggère une situation plus sécuritaire pour le consommateur, le niveau de risque initial étant plus élevé.

b) Analyse des scénarios de contamination initiale et de taux de croissance optimal

De façon générale (quelles que soient l'étape de prélèvement, l'hypothèse de comportement en cours d'affinage et la température de stockage testées), plus le niveau de contamination initiale et le taux de croissance optimal sont élevés, plus les niveaux de contamination des fromages sont élevés, ce qui augmente logiquement la probabilité de détection des lots positifs et donc réduit le risque en raison de la non-consommation des lots détectés positifs (tableau 9 et 10).

Ces scénarios permettent de prendre en compte l'incertitude liée à la méconnaissance des niveaux de contamination initiale dans le lait et la valeur du taux de croissance optimal sur le couple *Salmonella*-morbier.

c) Analyse des options d'échantillonnage relatives au nombre et à la taille des prélèvements

De façon générale (plan 1/2 ou plan 3/4) l'option d'échantillonnage correspondant au plan renforcé de la filière (n=5 x 25g) est plus efficace que l'option d'échantillonnage normal (n=1 x 25g). Pour illustration, en prenant l'exemple du scénario 5 ($m_c=10^{-4}$ UFC/mL et $\mu_{opt}=1$), le risque moyen est réduit de 12,55% (option stockage à 4-6°C) dans le cas du plan normal et de 48,74% dans le cas d'un échantillonnage correspondant au plan renforcé de la filière (tableaux 9, 10 et figure 10).

d) Analyse des options d'étapes de prélèvement par comparaison des hypothèses d'inactivation, ou non, pendant l'affinage

Sous l'hypothèse selon laquelle il n'y a pas d'inactivation au cours de l'affinage (Plan 1/2/3/4-H1), les résultats des simulations montrent que la croissance est inhibée à partir de la fin de l'acidification et jusqu'à la fin de vie du produit. Cependant, dans certaines conditions, une légère croissance est simulée à partir de J45. La probabilité de détection de lots positifs est donc équivalente si l'échantillonnage est effectué au pic de concentration (en fin d'acidification) ou à J25.

La comparaison des réductions de risque associées à la mise en place des plans 1/2/3/4-H1 (sous hypothèse que les concentrations en salmonelles restent constantes pendant l'affinage) et des plans 1/2/3/4-H2 (sous hypothèse d'inactivation pendant l'affinage), permet de conclure que les conclusions précédentes sur les scénarios et les options de stockage restent valables sous les deux hypothèses.

Cependant, sous l'hypothèse d'une inactivation à l'affinage, l'étape de prélèvement (au pic de concentration ou à J25) a un impact sur la réduction du risque : le prélèvement au pic (plan 1/2 H1) permet une détection plus probable, et une réduction plus importante du risque de salmonellose suite

à la consommation d'une portion de fromage provenant d'un lot quelconque fabriqué à partir de lait contaminé.

Ainsi, pour le taux d'inactivation appliqué et en reprenant l'exemple du scénario 5 ($m_0=10^{-4}$ UFC/mL et $\mu_{opt}=1$), la mise en œuvre d'un plan d'échantillonnage (plan 2 – H2) au pic de concentration en salmonelles permet de réduire le risque de 48,74% alors que la réduction de risque de salmonellose n'est que de 9,55% dans le cas d'un échantillonnage à J25 (plan 4- H2) (tableaux 9, 10 et figure 11). Le même écart de réduction est observé dans le cas d'un protocole « normal » d'échantillonnage (non renforcé= plan 1-H2 et plan 3-H2).

Tableau 9. Pourcentage moyen de réduction du risque de salmonellose sous l'hypothèse 1 (pas d'inactivation en affinage) par plan d'échantillonnage, par option de stockage et par scénario. L'intervalle de confiance à 90% représente la variabilité inter-lot.

	OPTIONS stockage	PLAN 1-H1 (au pic ; n=1 x 25g)		PLAN 2-H1 (au pic, n=5 x 25g)		PLAN 3-H1 (à J25 ; n=1 x 25g)		PLAN 4-H1 (à J25 ; n=5 x 25g)	
		Moyenne	[IC 90%]	Moyenne	[IC 90%]	Moyenne	[IC 90%]	Moyenne	[IC 90%]
SC1	OPT1	0,47	[0,43-0,52]	2,33	[2,12-2,55]	0,47	[0,43-0,52]	2,33	[2,12-2,55]
	OPT2	0,76	[0,65-0,87]	3,73	[3,23-4,28]	0,76	[0,65-0,87]	3,73	[3,23-4,28]
SC2	OPT1	4,60	[4,19-5,03]	20,97	[19,28-22,73]	4,60	[4,19-5,03]	20,97	[19,28-22,73]
	OPT2	7,32	[6,37-8,4]	31,58	[28,04-35,51]	7,32	[6,37-8,4]	31,58	[28,04-35,51]
SC3	OPT1	37,49	[34,81-40,3]	90,38	[88,22-92,42]	37,49	[34,81-40,3]	90,38	[88,22-92,42]
	OPT2	53,05	[48,19-58,34]	97,62	[96,27-98,74]	53,05	[48,19-58,34]	97,62	[96,27-98,74]
SC4	OPT1	1,33	[1,11-1,58]	6,47	[5,43-7,63]	1,33	[1,11-1,58]	6,47	[5,43-7,63]
	OPT2	3,44	[2,57-4,47]	16,01	[12,23-20,45]	3,44	[2,57-4,47]	16,01	[12,23-20,45]
SC5	OPT1	12,58	[10,65-14,76]	48,85	[43,04-55,01]	12,58	[10,65-14,76]	48,85	[43,04-55,01]
	OPT2	29,47	[23,24-36,79]	81,96	[73,35-89,91]	29,47	[23,24-36,79]	81,96	[73,35-89,91]
SC6	OPT1	73,60	[67,18-79,68]	99,84	[99,62-99,97]	73,60	[67,18-79,68]	99,84	[99,62-99,97]
	OPT2	96,42	[92,58-98,98]	100,00	[100-100]	96,42	[92,58-98,98]	100,00	[100-100]
SC7	OPT1	10,33	[7,37-14,09]	41,72	[31,81-53,19]	10,33	[7,37-14,09]	41,72	[31,81-53,19]
	OPT2	51,71	[34,1-72,07]	95,86	[87,57-99,83]	51,71	[34,1-72,07]	95,86	[87,57-99,83]
SC8	OPT1	65,34	[52,78-77,43]	99,25	[97,65-99,94]	65,34	[52,78-77,43]	99,25	[97,65-99,94]
	OPT2	99,65	[98,45-100]	100,00	[100-100]	99,65	[98,45-100]	100,00	[100-100]
SC9	OPT1	99,99	[99,95-100]	100,00	[100-100]	99,99	[99,95-100]	100,00	[100-100]
	OPT2	100,00	[100-100]	100,00	[100-100]	100,00	[100-100]	100,00	[100-100]

Tableau 10. Pourcentage moyen de réduction du risque de salmonellose sous l'hypothèse 2 (inactivation pendant l'affinage) par plan d'échantillonnage, par option de stockage et par scénario. L'intervalle de confiance à 90% représente la variabilité inter-lot.

	OPTIONS stockage	PLAN 1 -H2 (au pic ; n=1 x 25g)		PLAN 2-H2 (au pic ; n=5 x 25g)		PLAN3-H2 (à J25 ; n=1 x 25g)		PLAN 4-H2 (à J25 ; n=5 x 25g)	
		Moyenne	[IC 90%]	Moyenne	[IC 90%]	Moyenne	[IC 90%]	Moyenne	[IC 90%]
SC1	OPT1	0,47	[0,43-0,51]	2,33	[2,12-2,55]	0,07	[0,06-0,08]	0,35	[0,32-0,39]
	OPT2	0,76	[0,65-0,87]	3,73	[3,23-4,29]	0,11	[0,1-0,13]	0,57	[0,49-0,65]
SC2	OPT1	4,60	[4,19-5,05]	20,98	[19,26-22,82]	0,70	[0,64-0,77]	3,46	[3,15-3,8]
	OPT2	7,32	[6,38-8,37]	31,59	[28,07-35,41]	1,13	[0,98-1,3]	5,53	[4,81-6,33]
SC3	OPT1	37,50	[34,87-40,3]	90,39	[88,28-92,41]	6,79	[6,21-7,43]	29,65	[27,44-32,01]
	OPT2	53,03	[48,06-58,37]	97,61	[96,22-98,75]	10,71	[9,34-12,29]	43,20	[38,75-48,09]
SC4	OPT1	1,33	[1,11-1,57]	6,48	[5,43-7,61]	0,20	[0,17-0,24]	0,57	[0,42-0,75]
	OPT2	3,44	[2,59-4,49]	16,02	[12,28-20,51]	0,52	[0,39-0,68]	1,00	[0,83-1,18]
SC5	OPT1	12,55	[10,61-14,66]	48,75	[42,93-54,74]	1,99	[1,66-2,34]	9,55	[8,05-11,19]
	OPT2	29,39	[22,97-36,79]	81,83	[72,88-89,91]	5,10	[3,83-6,63]	22,95	[17,74-29,05]
SC6	OPT1	73,57	[67,31-79,73]	99,84	[99,63-99,97]	18,16	[15,4-21,24]	63,11	[56,67-69,7]
	OPT2	96,41	[92,63-98,94]	100,00	[100-100]	40,43	[32,31-49,38]	91,93	[85,78-96,68]
SC7	OPT1	10,29	[7,29-13,93]	41,60	[31,51-52,78]	1,62	[1,13-2,22]	7,81	[5,51-10,62]
	OPT2	51,31	[33,88-71,5]	95,72	[87,36-99,81]	10,58	[6-17,13]	41,97	[26,61-60,91]
SC8	OPT1	10,23	[7,18-14,03]	41,34	[31,11-53,04]	1,62	[1,13-2,23]	7,81	[5,5-10,68]
	OPT2	50,99	[33,38-71,59]	95,14	[86,87-99,82]	10,58	[6,02-17,26]	41,98	[26,7-61,23]
SC9	OPT1	10,22	[7,18-13,98]	41,30	[31,12-52,91]	1,62	[1,13-2,23]	7,81	[5,5-10,65]
	OPT2	50,93	[33,06-71,91]	94,97	[86,56-99,83]	10,58	[5,98-17,3]	42,00	[26,52-61,32]

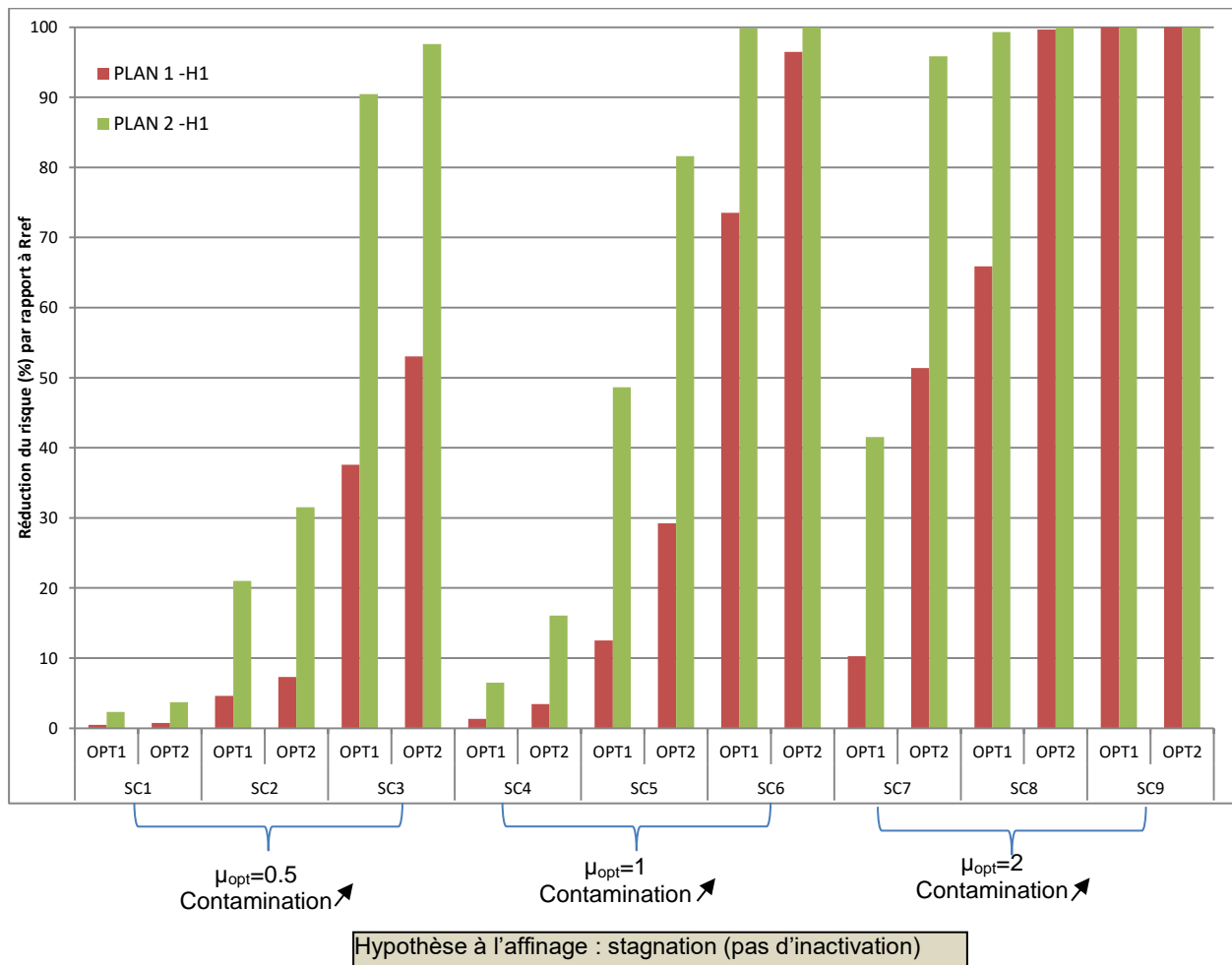


Figure 9. Pourcentage moyen de réduction du risque de salmonellose par portion de 45,5 g de morbier pour les deux protocoles d'échantillonnage testés (plans 1-H1 et 2-H1), les options de température de stockage et les neuf scenarios de contamination sous l'hypothèse H1) et d'un échantillonnage au pic (avant l'affinage).

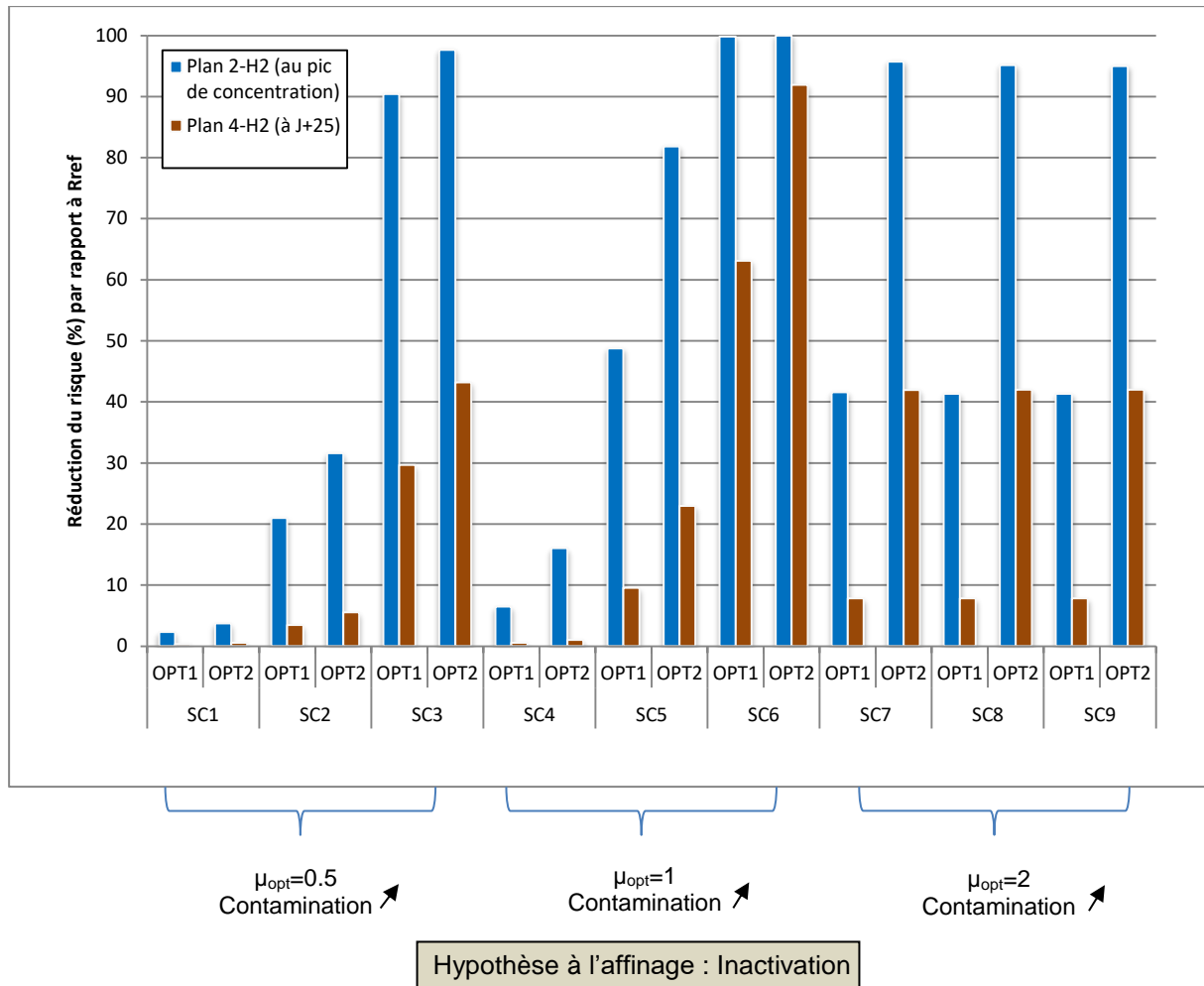


Figure 10. Pourcentage moyen de réduction du risque de salmonellose par portion de 45,5 g de morbier pour les neuf scenarios de contamination dans le cas d'un échantillonnage au pic ou pendant l'affinage à J25 sous l'hypothèse d'inactivation pendant l'affinage.

Les résultats des simulations indiquent que l'efficacité des plans est sensible au niveau de contamination du produit au moment du prélèvement. Ainsi en cas d'inactivation des salmonelles lors de l'affinage, l'échantillonnage à partir de J25 est moins efficace en termes de réduction du risque qu'un échantillonnage réalisé au pic de concentration (fin d'acidification).

L'augmentation du nombre d'échantillons prélevés et/ou de la prise d'essai (passage du plan 1 ou 3 au plan 2 ou 4) augmente la capacité à détecter des lots contaminés. Des différences d'efficacité importantes peuvent être observées entre ces plans (jusqu'à 50 % de réduction supplémentaire du risque pour le plan 2 par rapport au plan 1).

Le plan 4 correspondant à $n=5 \times 25$ g à J25 est le plan actuellement mis en œuvre en routine en filière morbier excepté pour les ateliers présentant un historique d'absence de salmonelles pendant les 3 derniers mois d'analyses (lait, fromage, coproduits et environnement). Ces ateliers ont alors la possibilité, par dérogation, de contrôler leurs lots avec $n=1$ et non $n=5$. Au regard des résultats de la modélisation la pertinence d'un tel assouplissement pose question. En effet, dans le contexte d'une faible prévalence de *Salmonella* dans un établissement, le risque de ne pas détecter un lot de fromage contaminé augmente lorsque le plan est allégé.

Les plans 2 et 4, qui correspondent à l'application du règlement CE 2073/2005, sont plus efficaces que les plans 1 et 3 pour augmenter la proportion de lots détectés non conformes et donc pour réduire le risque de salmonellose lié à la consommation de morbier.

3.2.6. Prise en compte de l'incertitude et limites de l'étude

L'absence de données spécifiques aux procédés de fabrication du morbier et du mont d'or limite la capacité de conclure quant à l'efficacité réelle des protocoles testés. C'est pourquoi l'étude a porté sur l'impact relatif des protocoles sur le risque.

Les différents scénarios permettent de prendre en compte l'incertitude liée à la méconnaissance des niveaux de contamination initiaux dans le lait et à la valeur du taux de croissance optimal sur le couple *Salmonella*-morbier.

Le modèle construit s'appuie sur les données disponibles et plusieurs options réalistes. L'estimation par les professionnels des valeurs de paramètres des procédés de transformation aujourd'hui non connues, permettra de simplifier considérablement le modèle pour passer d'une gamme de résultats possibles à une mesure quantitative des effets attendus des différents scénarios de protocole d'échantillonnage. Il a aussi été supposé que la méthode de détection des salmonelles présente une spécificité et une sensibilité de 100% alors qu'elles peuvent varier selon la méthode utilisée.

Afin de réduire l'incertitude, il apparaît important d'acquérir des données relatives :

- à la capacité de survie des salmonelles pendant l'affinage,
- au taux de croissance optimal μ_{opt} ,
- aux caractéristiques physico-chimiques (en particulier l'acide lactique) dans les fromages en distinguant le cœur et la croûte.

3.3. Conclusions du CES BIORISK

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

1) Concernant les questions 1 et 3 sur l'optimisation des plans d'échantillonnage opérés en filière sur la réduction de la probabilité de survenue de cas de salmonellose liés à la consommation de l'un des deux types de fromages

- Les résultats des simulations indiquent que l'efficacité des plans est sensible au niveau de contamination du produit au moment du prélèvement. Ainsi en cas d'inactivation des salmonelles lors de l'affinage, l'échantillonnage au pic de concentration des salmonelles se situant en fin d'acidification est plus efficace en termes de réduction du risque que celui réalisé à partir de J25.
- L'augmentation du nombre d'échantillons prélevés et/ou de la taille de la prise d'essai améliore la capacité de détecter des lots contaminés (l'efficacité relative de ces plans est reportée dans les tableaux 10 et 11).
- Le plan 4 correspondant à $n=5 \times 25$ g à J25 est le plan actuellement mis en œuvre en routine en filière morbier excepté pour les ateliers présentant un historique d'absence de salmonelles pendant les 3 derniers mois d'analyses (lait, fromage, coproduits et environnement). Ces ateliers-là ont alors la possibilité, par dérogation, de contrôler leurs lots avec $n=1$ et non $n=5$. Au regard des résultats de la modélisation, une telle dérogation entraîne une capacité nettement plus faible à détecter des lots de fromages positifs fabriqués avec des laits initialement faiblement contaminés.

Les plans 2 et 4, qui correspondent à l'application du règlement (CE) n°2073/2005, sont plus efficaces que les plans 1 et 3 pour la réduction du risque de salmonellose lié à la consommation de morbier.

2) Concernant la question 2 sur les données à acquérir pour optimiser la modélisation et les conclusions sur les protocoles d'échantillonnage

Il est nécessaire d'estimer les concentrations en salmonelles dans les laits servant à la fabrication de morbier et mont d'or. Au regard de l'effet de dilution dans les citernes de mélange des ateliers de fabrication, il serait préférable d'effectuer ce travail à partir des laits de tank de producteur.

Il est également nécessaire de réaliser des tests d'épreuves microbiologiques avec acquisition de tous les paramètres nécessaires à la modélisation du comportement bactérien (dans la pâte et dans la croûte du morbier et du mont-d'or) sur l'ensemble de la fabrication et pour plusieurs souches de *S. Dublin*. La réalisation de ces tests permettra de connaître les capacités de croissance, survie ou l'inactivation de ces souches de salmonelles pendant l'affinage et d'optimiser ainsi l'échantillonnage.

D'autre part, il est recommandé de centraliser :

- les données relatives à la traçabilité entre les tanks de ferme et les lots de fromages. Cette traçabilité, couplée à l'estimation des niveaux de contamination du lait de producteur en salmonelles permettra d'évaluer l'efficacité des protocoles d'analyse sur lait.
- les données de fabrication des deux types de fromage pour permettre leur mise à disposition.
- l'ensemble des résultats d'analyses (positifs et négatifs), en précisant les méthodes analytiques utilisées pour la détection des salmonelles notamment leurs performances et leur évolution au cours du temps ou des matrices.

Le CES BIORISK rappelle que la sécurité sanitaire des fromages morbier et mont d'or sera certainement mieux assurée dès lors que des mesures prophylactiques et sanitaires permettront de réduire la prévalence de *S. Dublin* dans les élevages des zones où ces fromages sont produits.

L'étude des facteurs de risque de contamination par *S. Dublin* dans les élevages de la zone de production de ces fromages est recommandée.

Concernant les précautions à adopter par le consommateur

La consommation de fromages au lait cru (à l'exception des fromages à pâte pressée cuite) est déconseillée aux jeunes enfants, aux femmes enceintes, aux personnes immunodéprimées et aux personnes âgées.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

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

L'Anses souligne le travail important de modélisation qui a été effectué pour apporter, en réponse à la saisine, une estimation quantitative en termes de réduction du risque de salmonellose associée aux scénarios d'autocontrôles testés. Si pour les configurations étudiées dans le cadre de cette expertise, les conclusions obtenues sont attendues et en phase avec ce qu'aurait fourni une expertise qualitative, seul un modèle tel que celui développé dans cette expertise permet de faire un lien chiffré entre plan d'échantillonnage et niveau de protection en santé publique. Les travaux soulignent que la mise au point d'un tel outil nécessite un important travail de collecte d'informations et de données en amont, afin de réduire le champ des incertitudes

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Salmonella Dublin ; Lait ; fromage ; Morbier ; Mont d'or ; Appréciation quantitative du risque.
Salmonella Dublin ; Milk ; cheese ; Morbier ; Mont d'or ; Quantitative Risk Assessment.

BIBLIOGRAPHIE

- Anses. 2017. Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3) (2014-2015). Maisons-Alfort : Anses 2014-2015. 566p.
- Augustin, J. C., V. Zuliani, M. Cornu, et L. Guillier. 2005. "Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions." *J Appl Microbiol* 99 (5) :1019-1042. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02710.x.
- Chatelard-Chauvin, C., F. Pelissier, S. Hulin, et M. C. Montel. 2015. "Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk Cantal type cheeses during cheese making, ripening and storage in different packaging conditions." *Food Control* 54:53-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.007>.
- Coroller, Louis, Sabine Jeuge, Olivier Couvert, Souad Christeians, et Mariem Ellouze. 2015. "Extending the gamma concept to non-thermal inactivation: A dynamic model to predict the fate of *Salmonella* during the dried sausages process." *Food Microbiology* 45:266-275. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.011>.
- Cummings, Kevin J., Lorin D. Warnick, Mara Elton, Lorraine D. Rodriguez-Rivera, Julie D. Siler, Emily M. Wright, Yrjo T. Gröhn, et Martin Wiedmann. 2010. "*Salmonella enterica* Serotype Cerro Among Dairy Cattle in New York: An Emerging Pathogen?" *Foodborne Pathogens and Disease* 7 (6):659-665. doi: 10.1089/fpd.2009.0462.
- Fares A.. Quantitative risk assessment model of human salmonellosis linked to the consumption of Camembert cheese made from raw milk. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English.
- Goodman, Laura B., Patrick L. McDonough, Renee R. Anderson, Rebecca J. Franklin-Guild, James R. Ryan, Gillian A. Perkins, Anil J. Thachil, Amy L. Glaser, et Belinda S. Thompson. 2017. "Detection of *Salmonella* spp. in veterinary samples by combining selective enrichment and real-time PCR." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29 (6):844-851. doi: 10.1177/1040638717728315.
- Hu, Xiaomei, Zhijin Chen, Kun Xiong, Jing Wang, Xiancai Rao, et Yanguang Cong. 2017. "Vi capsular polysaccharide: Synthesis, virulence, and application." *Critical Reviews in Microbiology* 43 (4):440-452. doi: 10.1080/1040841X.2016.1249335.
- Kirchner, M., I. McLaren, F. A. Clifton-Hadley, E. Liebana, A. D. Wales, et R. H. Davies. 2012. "A comparison between longitudinal shedding patterns of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Dublin on dairy farms." *Veterinary Record*. doi: 10.1136/vr.100865.
- Krascenicsova, K., E. Kaclikova, et T. Kuchta. 2006. "Growth of *Salmonella enterica* in model mixed cultures during a two-step enrichment." *New Microbiol* 29 (4):261-7.
- Laura, B. Goodman, L. McDonough Patrick, R. Anderson Renee, J. Franklin-Guild Rebecca, R. Ryan James, A. Perkins Gillian, J. Thachil Anil, L. Glaser Amy, et S. Thompson Belinda. 2017. "Detection of *Salmonella* spp. in veterinary samples by combining selective enrichment and real-time PCR." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29 (6):844-851. doi: 10.1177/1040638717728315.
- Miszczucha, Stéphane D., Frédérique Perrin, Sarah Ganet, Emmanuel Jamet, Fanny Tenenhaus-Aziza, Marie-Christine Montel, et Delphine Thevenot-Sergentet. 2013. "Behavior of Different Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes in Various Experimentally Contaminated Raw-Milk Cheeses." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (1):150-158. doi: 10.1128/aem.02192-12.
- Nielsen, L. R. 2013. "Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle." *Vet Microbiol* 162 (1):1-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.003.
- Olsen, J. E., K. H. Hoegh-Andersen, J. Casadesus, et L. E. Thomsen. 2012. "The importance of motility and chemotaxis for extra-animal survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Dublin." *J Appl Microbiol* 113 (3):560-8. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05363.x.
- Perrin, Frédérique. 2013. "Appréciation quantitative des risques liés à deux pathogènes d'intérêt pour la filière laitière: les *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines et *Salmonella* spp. ." Ecole Doctorale ABIES.
- 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.
- Rosso, L, J R Lobry, S Bajard, et J P Flandrois. 1995. "Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth." *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2):610-6.
- Santé Publique France. 2016. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives- Données de Déclaration obligatoire 2016. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques>
- Schvartzman, M. S., Maffre, A., Tenenhaus-Aziza, F., Sanaa, M., Butler, F., & Jordan, K. (2011). Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. *International journal of food microbiology*, 145, S31-S38.
- Teunis, P. F., Kasuga, F., Fazil, A., Ogden, I. D., Rotariu, O., & Strachan, N. J. (2010). Dose–response modeling of *Salmonella* using outbreak data. *International journal of food microbiology*, 144(2), 243-249.
- Van Kessel, J. A., J. S. Karns, J. E. Lombard, et C. A. Koprak. 2011. "Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies." *J Food Prot* 74 (5):759-68. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-10-423.
- Veling, J., H.W. Barkema, L. Van der Schans, F. Van Zijderveld, J. Verhoeff. 2002. "Herd-level diagnosis for *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Dublin infection in bovin dairy herds." *Prev Vet Med* Feb 14; 53 (1-2): 31-42
- Warnick, L. D., J. B. Kaneene, P. L. Ruegg, S. J. Wells, C. Fossler, L. Halbert, et A. Campbell. 2003. "Evaluation of herd sampling for *Salmonella* isolation on midwest and northeast US dairy farms." *Preventive Veterinary Medicine* 60 (3):195-206. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00141-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00141-7).
- Wray, C, et A Wray. 2000. *Salmonella* in domestic Animals. Edité par CABI Publishing.
- Zhai, L., X. Kong, Z. Lu, F. Lv, C. Zhang, et X. Bie. 2014. "Detection of *Salmonella enterica* serovar Dublin by polymerase chain reaction in multiplex format." *J Microbiol Methods* 100:52-7. doi: 10.1016/j.mimet.2014.02.014.

ANNEXE 1 : PRESENTATION DES INTERVENANTS

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

RAPPORTEURS

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

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

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

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

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

Présidente

Mme Isabelle VILLENA – CHU Reims. Parasitologie, infectiologie

Membres

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

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

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

M. Frédéric CARLIN – INRA. Microbiologie des aliments, filière fruits et légumes, technologie de décontamination

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mme Muriel THOMAS – INRA. Microbiote intestinal, probiotiques

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Diane CUZZUCOLI – Chargée de projets scientifiques et techniques – Unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM) – Direction de l'Evaluation des Risques

Mme Nathalie ARNICH - Adjointe au chef d'unité - UERALIM - Direction de l'Evaluation des Risques

Contribution scientifique

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

Mme Sonia POISSON - Chargée de projets scientifiques et techniques – Unité Méthodologie et Etudes (UME) – Direction de l'Evaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Direction de l'Evaluation des Risques

Mme Catherine FRANÇOIS – Direction de l'Evaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITES EXTERIEURES

Mme Florence ARNAUD -- Syndicats Interprofessionnels AOP Morbier - Mont d'Or

Mme Caroline CHATELARD-CHAUVIN -- Pôle fromager AOP Massif central

Mme Choreh FARROCK – Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière

Mme Charlotte MARION -- Centre Technique des Fromages Comtois

Mme Valérie MICHEL -- ACTALIA

Mme Fanny TENENHAUS-AZIZA – Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière

ANNEXE 2

Modèle primaire de croissance : modèle logistique avec délai de rupture (Rosso *et al.*, 1995)

$$\frac{dy}{dt}(t) = 0, \quad t \leq lag$$

$$\frac{dy}{dt}(t) = \mu_{max}(t) \times y(t) \times \left(1 - \frac{y(t)}{y_{max}}\right), \quad t > lag$$

$$\frac{dy}{dt}(t) = 0, \quad t \leq lag$$

$$\frac{dy}{dt}(t) = \mu_{max}(t) \times y(t) \times \left(1 - \frac{y(t)}{y_{max}}\right), \quad t > lag$$

Où y est la taille de la population bactérienne (unité), y_{max} est la population maximale en phase stationnaire (unité), t est le temps en heure, lag représente le temps de latence en heure et μ_{max} est le taux de croissance maximal.

Modèle secondaire de croissance : modèle cardinal avec interactions (Augustin *et al.*, 2005)

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \gamma(T) \times \gamma(pH) \times \gamma(a_w) \times \lambda([AH]) \times \xi(T, pH, a_w, [AH])$$

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \gamma(T) \times \gamma(pH) \times \gamma(a_w) \times \lambda([AH]) \times \xi(T, pH, a_w, [AH])$$

Avec

$$\gamma(T) = \frac{(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})((T_{opt} - T_{min})(T - T_{min}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T))}$$

$$\gamma(pH) = \frac{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min})}{((pH_{opt} - pH_{min})(pH - pH_{min}) - (pH_{opt} - pH_{max})(pH_{min} - pH))}$$

$$\gamma(a_w) = \frac{(a_w - a_{wmin})}{(a_{wopt} - a_{wmin})} \quad \gamma(pH) = \frac{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min})}{((pH_{opt} - pH_{min})(pH - pH_{min}) - (pH_{opt} - pH_{max})(pH_{min} - pH))}$$

$$\gamma(a_w) = \frac{(a_w - a_{wmin})}{(a_{wopt} - a_{wmin})} \quad \text{si } a_{wmin} \leq a_w < 1$$

$$\gamma([AH]) = \left(1 - \frac{[AH]}{MIC_u}\right)^\alpha$$

Interactions :

$$\xi = \begin{cases} 1 & \psi \leq 0.5 \\ 2(1 - \psi) & 0.5 < \psi < 1 \\ 0 & \psi \geq 1 \end{cases}$$

$$\xi = \begin{cases} 1 & \psi \leq 0.5 \\ 2(1 - \psi) & 0.5 < \psi < 1 \\ 0 & \psi \geq 1 \end{cases}$$

avec

$$\psi = \sum_i \frac{\varphi(i)}{2 \prod_{j \neq i} [(1 - \varphi(j))]}$$

avec

$$\psi = \sum_i \frac{\varphi(i)}{2 \prod_{j \neq i} [(1 - \varphi(j))]}$$

et

$$\varphi(X) = \left(\frac{X_{opt} - X}{X_{opt} - X_{min}}\right)^3; \quad X = T, pH \text{ ou } a_w \quad \varphi(X) = \left(\frac{X_{opt} - X}{X_{opt} - X_{min}}\right)^3; \quad X = T, pH \text{ ou } a_w$$

$$\varphi(X) = 1 - SR(X); \quad X = [AH] \quad \varphi(X) = 1 - SR(X); \quad X = [AH]$$