



**COMITÉ SCIENTIFIQUE DE
L'AGENCE FÉDÉRALE POUR LA SÉCURITÉ
DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE**

AVIS 15-2012

Objet: Prévention, détection, traçage rapide et maîtrise des foyers épidémiques d'*Escherichia coli* productrices de Vérotoxines pathogènes pour l'homme dans la chaîne alimentaire (dossier Sci Com 2011/18: auto-saisine).

Avis approuvé par le Comité scientifique le 20 avril 2012.

Résumé

Vu la gravité du foyer épidémique d'*Escherichia coli* O104:H4 au printemps 2011 en Allemagne et du cluster français qui y a été associé, le Comité scientifique donne un avis concernant la prévention, la détection, le traçage rapide et la maîtrise des foyers épidémiques d'*Escherichia coli* productrices de Véro(cyto)toxines pathogènes pour l'homme (VTEC) dans la chaîne alimentaire.

Les VTEC pathogènes pour l'homme connues et reconnues actuellement comme importantes pour leur pathogénicité, contiennent des gènes pour la production de Vérotoxines (gènes *stx* ou *vtx*) et peuvent contenir une combinaison des gènes de virulence ci-après: des gènes pour l'adhésion dans l'intestin (ex. gène *eae*, gène *saa*, gène *lpf*), des gènes codant pour d'autres facteurs d'adhésion (ex. 'Aggregative Adherence Fimbriae') et leurs régulateurs. Le gène *ehx*, qui code pour l'entérohémolysine, est parfois présent chez les VTEC pathogènes pour l'homme.

Les denrées alimentaires font l'objet d'un screening via la culture et des techniques moléculaires telles que la PCR, qui sont surtout axées sur la détection des gènes *stx* et du gène *eae*. En cas de résultats positifs, il est fortement recommandé de capter les souches par immunocapture et/ou milieux d'isolation (chromogènes) sélectifs, afin de confirmer ensuite la présence des gènes de virulence précités dans des colonies bactériennes séparées. Une confirmation de la souche par isolation est nécessaire parce que la détection moléculaire d'une combinaison de gènes de virulence dans les denrées alimentaires n'exclut pas que les gènes de virulence soient présents dans plusieurs souches d'*E. coli* qui, prises chacune séparément, sont peu ou pas pathogènes pour l'homme.

Les denrées alimentaires suivantes constituent des produits à risque pour les VTEC pathogènes pour l'homme: le lait cru (ou insuffisamment cuit) et les produits laitiers à base de lait cru (ou insuffisamment cuit), les viandes bovines crues (ou insuffisamment cuites) ou la viande provenant d'autres (petits) ruminants, les légumes à feuilles et légumes-fruits frais, les graines germées, les herbes (potagères) aromatiques fraîches, les fruits rouges doux et, les légumes, fruits et céréales prédécoupés et préemballés de la quatrième gamme.

Le Comité scientifique n'a pas de base scientifique directe pour étendre le programme de contrôle de l'AFSCA en 2012 à la détection d'autres sérogroupes de VTEC par rapport aux sérogroupes recherchés en 2011. Il est bien recommandé d'évaluer annuellement le programme de contrôle en ce qui concerne les VTEC pathogènes pour l'homme en fonction des connaissances à propos des sérotypes pathogènes pour l'homme en circulation, de procéder à des contrôles sur la maîtrise de la contamination fécale via l'analyse d'*E. coli*, en parallèle avec les contrôles des VTEC, et, outre le screening de recherche de la présence de gènes *stx* et du gène *eae* et les sérogroupes de VTEC prioritaires, de s'intéresser également à la présence de la combinaison de facteurs de virulence pertinents, et ce sur la suggestion du Laboratoire National de Référence (LNR) pour les VTEC, le Laboratoire européen de Référence (EU-RL) pour les VTEC ou d'autres groupes de recherche spécialisés.

Le Comité scientifique recommande que l'AFSCA veille à l'utilisation des bonnes pratiques d'hygiène de travail, tant lors de la production animale, que lors de la production végétale. Il faut souligner l'importance de l'hygiène personnelle et surtout de l'hygiène des mains du personnel actif à tous les stades de la chaîne alimentaire. Le guide sectoriel de la production primaire et le guide sectoriel de l'industrie de transformation des pommes de terre, fruits et légumes, doivent être étendus à des recommandations spécifiques pour les produits à risque tels que les légumes à feuilles, les herbes potagères fraîches et les graines germées. Au niveau de la production primaire végétale et de la transformation, un encadrement et une information suffisants concernant les dangers microbiologiques et les voies de transmission possibles à l'homme doivent être prévus. L'utilisation d'une eau d'une qualité microbiologique suffisante doit être un point d'attention particulier.

Dans le secteur médical, on a besoin d'une bonne communication entre les laboratoires cliniques et un rapportage central rapide et efficace des cas humains de syndrome hémolytique et urémique (SHU), aussi en ce qui concerne les caractéristiques des isolats (virulence, sérotype, ...). Tous les cas de diarrhée sanglante et de SHU doivent être étudiés sur base de diagnostic microbiologique et, par conséquent, toutes les ressources qui rendent cela possible doivent être mises à la disposition du secteur médical. En outre, on a besoin d'une bonne interaction et coordination et d'un échange d'informations adéquat entre les divers laboratoires nationaux et européens de référence pour l'analyse des VTEC dans les échantillons provenant de l'homme, de l'animal et des denrées alimentaires. Le Comité scientifique soutient fortement l'actualisation et la vérification continues d'un plan de crise et de communication efficace de telle sorte que toutes les parties concernées (autorités, laboratoires, centres de connaissances et secteurs concernés) puissent réagir et communiquer rapidement, adéquatement et en concertation en vue de la détection précoce des infections alimentaires par des VTEC pathogènes pour l'homme. Enfin, il est indiqué que le LNR pour les VTEC, le EU-RL pour les VTEC ou d'autres groupes de recherche spécialisés développent des techniques moléculaires permettant d'opérer un screening rapide et efficace des cultures et isolats quant à la présence d'un large éventail de facteurs de virulence. Il faut aussi prêter l'attention nécessaire au développement de meilleures méthodes de détection, en particulier dans des produits avec une haute charge microbiologique, comme une étape d'accumulation adéquate préalablement au screening au moyen, par exemple, de la PCR.

Summary

Advice 15-2012 of the Scientific Committee of the FASFC on the prevention, detection, fast tracing and management of outbreaks of human pathogenic Verotoxin producing *Escherichia coli* in the food chain

Given the severity of the outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 in the spring of 2011 in Germany and the related cluster in France, the Scientific Committee gives advice regarding the prevention, detection, rapid tracing and management of outbreaks of human pathogenic Verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) in the food chain.

Human pathogenic VTEC that are currently known and recognized as important in causing disease, contain genes for the production of Verotoxins (*stx* or *vtx* genes) and can contain a combination of the following virulence genes: genes for adhesion in the intestine (e.g. *eae* gene, *saa* gene, *lpf* gene), genes encoding other adhesion factors (e.g. 'Aggregative Adherence Fimbriae'), and their regulators. The *ehx* gene encoding enterohemolysin is sometimes found in human pathogenic VTEC.

Foods are screened using culture and molecular techniques such as PCR, which are mainly focused on the detection of *stx* genes and the *eae* gene. When the results are positive, it is strongly recommended to pick up the strains with immunocapture methods and/or (chromogenic) selective isolation media to confirm the presence of the above virulence genes in individual bacterial colonies. Confirmation via isolation of the strain is necessary as the molecular detection of a combination of virulence genes in foods does not exclude that virulence genes are present in different *E. coli* strains which individually are little or not pathogenic for humans.

The following foods can represent a risk for the consumer: raw (or undercooked) milk and dairy products made from raw (or undercooked) milk, raw (or undercooked) beef or meat from other (small) ruminants, fresh leafy vegetables and vegetables that are botanically fruits, sprouted vegetables, fresh aromatic (garden) herbs, soft red fruit and sliced and packaged fruit, vegetables and grains of the fourth gamma.

The Scientific Committee has no direct scientific basis to expand the control program of the FASFC in 2012 to the detection of other VTEC serogroups compared to the serogroups examined in 2011. But it is recommended to annually evaluate the control program with respect to human pathogenic VTEC in function of the knowledge about circulating human pathogenic serotypes, to control the management of faecal contamination through analysis of *E. coli*, in parallel with controls of VTEC, and also, in addition to the screening for the presence of *stx* genes and the *eae* gene and priority VTEC-serogroups, to pay attention to the presence of the combination of relevant virulence factors, and this at the suggestion of the National Reference Laboratory (NRL) for VTEC, the European Reference Laboratory (EU-RL) for VTEC or other expert research groups.

The Scientific Committee recommends that the FASFC monitors the use of good hygienic work practices during both the animal production and the plant production. The personal hygiene, and especially the hand hygiene of the personnel involved in all stages of the food chain should be emphasized. The sector guide for the primary production and the sector guide for the potato, vegetable and fruit processing industry should be extended with specific recommendations for high risk products such as leafy vegetables, fresh garden herbs and sprouted vegetables. At the level of the primary plant production and processing, sufficient guidance and information should be provided with regard to the microbiological hazards and the possible transmission routes to humans. The use of water with an adequate microbiological quality must be a particular point of attention.

In the medical sector, there is a need for good communication between clinical laboratories and a fast and efficient reporting on one central point of the hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans, also with regard to the characteristics of the isolates (virulence, serogroup, ...). All cases of bloody diarrhea and HUS must be investigated on the basis of microbiological

diagnosis and consequently, all the resources that make this possible, must be provided to the medical sector. Furthermore, there is a need for a good interaction and coordination and an adequate exchange of information between the various national and European reference laboratories for the analysis of VTEC in samples from humans, animals and food. The Scientific Committee strongly supports the continuous updating and verifying of an adequate crisis and communication plan so all stakeholders (government, laboratories, knowledge centers and involved sectors) can quickly and appropriately and in concert respond and communicate for the early detection of food poisoning with human pathogenic VTEC. Finally, it is recommended that the NRL for VTEC, the EU-RL for VTEC or other expert research groups develop molecular techniques that provide a fast and efficient way of screening cultures and isolates for the presence of a wide range of virulence factors. Attention should also be paid to the development of better detection methods, especially in products with a high microbiological load, such as an accumulation step prior to the screening with, for example, PCR.

Mots clés

Escherichia coli – VTEC/STEC – foyer épidémique – légumes (germés) – SHU

1. Termes de référence

Suite au foyer épidémique d'*Escherichia coli* O104:H4 au printemps 2011 en Allemagne et du cluster français qui y a été associé, ce dossier a été démarré en auto-saisine pour établir des recommandations à l'attention des diverses parties concernées en vue de la prévention, de la détection, du traçage rapide et de la maîtrise des foyers épidémiques d'*Escherichia coli* pathogènes pour l'homme et productrices de Vérotoxines (VTEC) dans la chaîne alimentaire. Le Comité scientifique, dans cet avis, prend ses distances par rapport à l'incident grave et mène une réflexion stratégique dans laquelle les questions ci-après occupent une place centrale :

- Quels facteurs de virulence et quelles combinaisons de ces facteurs sont responsables de la pathogénicité des *E. coli* chez l'homme, et dans quels sérotypes ces facteurs de virulence peuvent-ils être présents?
- Sur base de quels tests les VTEC pathogènes pour l'homme peuvent-elles être détectées et quelles en sont les limites?
- Quelles denrées alimentaires sont des produits à risque pour la contamination par des VTEC pathogènes pour l'homme?
- Dans quelle mesure le programme de contrôle de l'AFSCA peut-il détecter les VTEC pathogènes pour l'homme, et le système d'autocontrôle peut-il prévenir les foyers épidémiques de VTEC?
- Quelles mesures additionnelles de maîtrise et de contrôle l'AFSCA peut-elle prendre pour prévenir les foyers épidémiques de VTEC?
- Quelle approche peut-on appliquer pour empêcher que des foyers épidémiques (inattendus) de VTEC s'aggravent en crise?

Considérant les débats menés lors de la réunion du groupe de travail du 16 septembre 2011 et de la séance plénière du 20 avril 2012;

le Comité scientifique donne l'avis suivant:

2. Avis

2.1. Quels facteurs de virulence et quelles combinaisons de ces facteurs sont responsables de la pathogénicité des *E. coli* chez l'homme, et dans quels sérotypes ces facteurs de virulence peuvent-ils être présents?

Des souches pathogènes d'*E. coli* peuvent être regroupées sur base de la combinaison de symptômes cliniques et de facteurs de virulence (connus). Les *E. coli* extra-intestinales et pathogènes comprennent les *E. coli* uropathogènes (UPEC), qui sont responsables d'infections des voies urinaires, et les *E. coli* associées à la méningite (MAEC), qui causent la méningite chez les nouveau-nés. Les *E. coli* intestinales et pathogènes (IPEC) sont responsables d'une gamme de maladies diarrhéiques et de syndromes chez l'homme et comprennent les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entéroinvasives (EIEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéroagrégatives (EAEC) et les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), qui ont un réservoir humain et sont principalement transmises par voie fécale-orale, rarement via les aliments ou l'eau. Elles comprennent aussi les *E. coli* productrices de Vérotoxines (VTEC) ou *E. coli* productrices de Shigatoxines (STEC), qui ont un réservoir animal (principalement les bovins) et sont souvent associées à des foyers épidémiques d'origine alimentaire. Toutefois, beaucoup de VTEC sont pathogènes pour des animaux et non zoonotiques. Les VTEC sont caractérisées par leur capacité à produire des Vérotoxines. Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont un sous-groupe de VTEC et sont

associées à des symptômes de colite hémorragique (CH) et le syndrome hémolytique et urémique (SHU) (ILSI Europe, 2011). Les "EHEC typiques" sont aussi positives pour le gène *eae*.

Toutefois, une séparation stricte entre les groupes n'existe pas, et de nouvelles combinaisons de facteurs de virulence peuvent à tout moment apparaître après l'acquisition ou la perte d'éléments génétiques mobiles qui sont associés à ces gènes de virulence. Certaines EPEC sont, par exemple, étroitement apparentées aux VTEC *eae*-positives, surtout par la correspondance des sérotypes et l'homologie du gène *eae*. Il est possible que les EPEC absorbent des gènes *stx* par transduction bactériophage, et peuvent ainsi provoquer le SHU chez l'homme. Par définition, pareilles souches ne sont plus des EPEC mais bien des VTEC. Les EAEC peuvent également absorber des gènes *stx*. Par exemple, la souche épidémique *E. coli* O104:H4 était un EAEC qui pouvait être regroupée comme un EAEC-VTEC après l'acquisition du gène *stx*. Ce qui explique la complexité de la classification des souches d'*E. coli* pathogènes.

Les **VTEC** produisent des toxines, des Véro(cyto)toxines (*vtx*) ou des Shigatoxines (*stx*), qui sont létales pour les cellules Véro (cellules rénales d'une espèce africaine de singe). Vu que les gènes *stx* se trouvent dans les bactériophages, ils peuvent être transférés entre différentes souches d'*E. coli* via transduction de bactériophages (Herold *et al.*, 2004). Il existe plus de 400 sérotypes de VTEC, qui peuvent être classés en différents sérotypotypes (Karmali *et al.*, 2003). Cette classification se fait sur base de l'incidence relative, de la fréquence d'implication dans les foyers épidémiques et de l'association à des maladies graves comme le SHU ou la CH. Le tableau 1 montre la classification des sérotypes de VTEC en sérotypotypes. Tous les sérotypotypes sont *stx*-positifs, certains sont également *eae*-positifs (ex. sérotypotypes A et B). Ces derniers produisent l'adhésine intimine et provoquent souvent la CH et/ou le SHU. Tous les sérotypotypes peuvent être associés à la diarrhée. Vu sa faible incidence relative, l'absence d'épidémies antérieures et son association au SHU au cours du foyer épidémique en Allemagne, la souche épidémique *E. coli* O104:H4 pourrait appartenir au sérotypotype C. Vu son association à l'adhésion entéroagrégative, ce sérotype pourrait aussi être considéré comme un sérotypotype séparé.

Tableau 1. Classification des sérotypes de VTEC en sérotypotypes (source : Karmali *et al.*, 2003)

Seropathotype	Relative incidence	Frequency of involvement in outbreaks	Association with severe disease ^a	Serotypes
A	High	Common	Yes	O157:H7, O157:NM
B	Moderate	Uncommon	Yes	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Low	Rare	Yes	O91:H21, O104:H21, O113:H21; others
D	Low	Rare	No	Multiple
E	Nonhuman only	NA ^b	NA	Multiple

^a HUS or hemorrhagic colitis.

^b NA, not applicable.

Les VTEC peuvent être présentes chez l'homme et chez l'animal et les deux peuvent être pathogènes. Les souches classiques VTEC O157, O26, O103, O111 et O145 (= le 'gang of five') sont définies comme des bactéries zoonotiques avec un réservoir chez les animaux domestiques agricoles. Les souches de VTEC pathogènes pour l'homme peuvent, après ingestion par l'homme, provoquer une maladie (diarrhée sanglante, CH et/ou le SHU, plus grave). La combinaison des facteurs génétiques faisant en sorte qu'une VTEC puisse provoquer la CH ou le SHU est inconnue. Jusqu'à présent, on n'a toujours pas un tableau suffisant des mécanismes exacts de la pathogénicité des VTEC et des facteurs de virulence qui y sont impliqués et de leurs régulateurs. Les VTEC peuvent contaminer l'homme via des aliments contaminés, et vu la faible dose infectieuse, également par contact direct de l'homme avec des animaux (ex. lors d'une visite dans une ferme pédagogique) ou par contact direct avec des personnes contaminées.

Jusqu'à présent, les **EAEC** étaient exclusivement associées à des infections humaines et ne sont pas encore bien connues à ce jour. On ne dispose que de peu d'informations sur la distribution des EAEC dans la chaîne alimentaire, cependant, certaines études montrent que ces souches n'ont pas pour origine l'animal ou les aliments (Cassar *et al.*, 2004; Uber *et al.*,

2006). Elles sont surtout présentes chez l'homme dans les pays en développement et sont connues comme une cause de "tourista". Les denrées alimentaires importées de ces pays peuvent avoir été contaminées suite à une manipulation par des travailleurs (présentant ou non des symptômes de diarrhée) dont l'hygiène personnelle est déficiente et qui sont porteurs du germe. Bien que les EAEC aient un réservoir humain, elles peuvent provoquer des foyers épidémiques associés aux aliments par un transfert semblable de l'homme aux denrées alimentaires. Les EAEC contiennent un ou plusieurs facteur(s) d'adhésion tel(s) que les 'Aggregative Adherence Fimbriae', codées par les gènes *aaf*, et le gène *aggR* (gène régulateur de l'adhésion agrégative).

La souche épidémique *E. coli* O104:H4 qui a provoqué la CH et le SHU, a probablement un réservoir humain à partir duquel la chaîne alimentaire a été contaminée et peut également provoquer des cas secondaires par transmission de l'homme à l'homme. La souche a été désignée comme une *E. coli* entéroagrégative et entérohémorragique (EAHEC), une EAEC-VTEC ou une AggVTEC (Piérard *et al.*, 2012), étant donné que la souche a, d'une part, des gènes qui typent pour l'EAEC, d'autre part des gènes qui typent pour les VTEC. Sur base du séquençage du génome total de la souche épidémique (93 % d'identité avec le génome total de la souche d'EAEC 55989), il a été clairement démontré qu'il s'agissait d'une nouvelle souche d'*E. coli* pathogène pour l'homme. Il s'agit d'une souche d'EAEC dotée d'un fort potentiel d'adhérence qui a acquis le gène *stx2* par transfert horizontal, qui lui confère la possibilité de produire une toxine qui la rend virulente. Cette combinaison de facteurs de virulence de différents types pathogènes indique l'apparition de transfert latéral ou horizontal de gènes chez *E. coli* et la dynamique de la présence de facteurs de virulence (Mellmann *et al.*, 2009) et a déjà été rapportée chez les souches rares de ce sérotype (Scheutz *et al.*, 2011), ainsi que chez O111:H2 (Morabito *et al.*, 1998) et O86:HNM (Iyoda *et al.*, 2000), ceux-ci ont provoqué des infections humaines avec des symptômes de CH et de SHU. Le sérotype *E. coli* O104:H4 n'est pas couramment associé à la maladie chez l'homme. Dans le passé, seuls des cas sporadiques associés au sérotype d'*E. coli* O104:H4 ont été rapportés: Allemagne (2001), France (2004), Géorgie (2009) et Finlande (2010). Jusqu'à présent, ces souches n'avaient jamais été associées à une épidémie aussi importante que celle observée en Allemagne et en France en 2011 (Jourdan-da Silva *et al.*, 2011). Par conséquent, il n'y a presque pas d'informations sur l'épidémiologie de cette souche et par analogie, on ne peut se baser que sur l'épidémiologie de l'EAEC pour se faire une idée de cette VTEC dite EAEC.

La souche épidémique *E. coli* O104:H4 présente les caractéristiques suivantes (EFSA, 2011):

- gène *stx1* non présent
- gène *stx2a* présent
- gène *eae* (intimine) non présent
- gène *ehx* (entérohémolysine) non présent
- plasmide de virulence EAEC présent
- gène *aafA* ('Aggregative Adherence Fimbriae' type 1) présent
- gène *aggR* (régulateur de l'adhésion agrégative) présent
- multi-locus sequence type (MLST): ST678
- plasmide présent avec gènes d'antibiorésistance (gène *bla_{CTX-M-15}* et gène *bla_{TEM-1}*)
- profil de résistance antimicrobienne : ampicilline, amoxicilline, céfuroxime, céfoxitine, céfotaxime, ceftazidime, cefpodoxime, streptomycine, acide nalidixinique, tétracycline, triméthoprim/sulfaméthoxazole, pipéracilline et céfuroxime-axetil. Le rôle de la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans le caractère pathogène de la souche n'est pas clair.

Le sérotype O104 en soi ne donne toutefois pas suffisamment d'informations sur la pathogénicité de la souche, étant donné que cette dernière est essentiellement déterminée par la présence de certains facteurs de virulence. Les VTEC pathogènes pour l'homme dans la chaîne alimentaire connues à ce jour comme importantes pour leur capacité à provoquer la maladie sont caractérisées par des gènes pour la production de Vérotoxines (gènes *stx*), des gènes pour l'adhérence à l'intestin (gène *eae*, gène *saa*, gène *lpf*) ou des gènes codant pour d'autres facteurs d'adhésion ('Aggregative Adherence Fimbriae'), et leurs régulateurs. La production de toxines est nécessaire mais pas suffisante pour provoquer le SHU. La production d'intimine (codée par le gène *eae*) et la lésion qui s'ensuit entraînent une réaction inflammatoire dans l'intestin. Ensuite, la diarrhée apparaît et, s'il y a davantage de toxines produites, c'est la diarrhée sanglante qui apparaît. Le gène *eae* peut être remplacé par

d'autres facteurs d'adhérence, et il est théoriquement possible que le même effet se produise. Un autre facteur contribuant à des infections (graves) est l'entérohémolysine, codée par le gène *ehx* (lié au plasmide), que l'on rencontre fréquemment dans les souches de VTEC de sérotypes A et B (voir tableau 1) impliquées dans les cas cliniques. D'un part, il existe des souches humaines appartenant à ces sérotypes qui ne portent pas le plasmide avec le gène codant l'entérohémolysine. D'autre part, il existe des souches de VTEC isolées des aliments ou des animaux qui portent ce gène *ehx* et qui ne sont pas pathogènes pour l'homme. L'implication du gène *ehx* et du plasmide, qui porte ce gène, dans la virulence des VTEC, est encore insuffisamment élucidée (Bugarel *et al.*, 2010 (b)). Le spectre complet des facteurs de virulence possibles et nécessaires (ou leurs variantes) et leurs mécanismes régulateurs sont jusqu'à présent insuffisamment connus, et une étude complémentaire à leur sujet reste recommandée.

D'une manière générale, la virulence au sein des bactéries pathogènes est modulée par l'acquisition d'éléments génétiques mobiles comme les bactériophages, les transposons, les plasmides et les îlots génomiques. Les îlots génomiques comprennent la classe des 'îlots de pathogénicité', celle-ci porte des gènes de virulence responsables de l'infection de l'hôte. Ces îlots de pathogénicité constituent un regroupement exogène de gènes mobilisables contribuant au pouvoir pathogène de la souche qui le porte. Ils sont un indicateur d'une souche pathogène. Un îlot de pathogénicité des souches de VTEC, l'îlot de pathogénicité LEE, est porteur de gènes codant pour des exécuteurs de type III jouant un rôle dans la virulence des souches de VTEC. L'îlot de pathogénicité LEE est aussi porteur du gène *eae*. Plusieurs autres de ces îlots nommés OI-36, OI-43, OI-48, OI-71, OI-115, OI-122, OI-140, OI-141 et OI-154 semblent aussi jouer un rôle dans la virulence des différentes VTEC. Les îlots OI-122 et OI-71 ont été étudiés par différentes équipes qui ont montré la stabilité de certains gènes appartenant à ces îlots chez des souches pathogènes de VTEC (Coombes *et al.*, 2008; Konczyk *et al.*, 2008; Bugarel *et al.*, 2010 (a)). Concernant les gènes de virulence, il existe au sein des gènes *stx1*, *stx2* et *eae* de nombreuses variantes et les 'EHEC typiques' majoritairement impliquées dans les cas de SHU présentent les caractéristiques génétiques suivantes:

- EHEC O157:H7 = *rfbE*_{O157}, *fliC*_{H7}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-gamma, (OI-122)
- EHEC O145:H28 = *wzx*_{O145}, *fliC*_{H28}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-gamma, (OI-122)
- EHEC O111:H8 = *wzx*_{O111}, *fliC*_{H8}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-theta, (OI-122)
- EHEC O103:H2 = *wzx*_{O103}, *fliC*_{H2}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-epsilon, (OI-122)
- EHEC O26:H11 = *wzx*_{O26}, *fliC*_{H11}, *stx1* et/ou *stx2*, *eae*-beta, (OI-122)

La détection de l'îlot OI-122 confirme la virulence de la souche, mais l'absence de détection n'apporte pas nécessairement la preuve d'un manque de virulence. Les 'EHEC atypiques' (ex. EHEC O91) classées dans le sérotype C sont négatives pour *eae* et le OI-122.

2.2. Sur base de quels tests les VTEC pathogènes pour l'homme peuvent-elles être détectées et quelles en sont les limites?

Les denrées alimentaires font l'objet d'un screening quant à la présence de VTEC (et/ou des sérotypes de VTEC prioritaires) via la culture et des techniques moléculaires comme la PCR, qui sont surtout axées sur la détection des gènes *stx* et du gène *eae*. En cas de résultats positifs, il est fortement recommandé de capter les souches via des méthodes d'immunocapture axées sur les antigènes spécifiques et bactériens de surface et/ou sur les milieux d'isolation sélectifs (chromogènes) (sur base de caractéristiques biochimiques liées au sérotype), pour confirmer ensuite la présence des gènes de virulence précités dans des colonies bactériennes séparées. Comme alternative, on commence par isoler de la denrée alimentaire les souches de certains sérotypes via des milieux d'isolation sélectifs (chromogènes), en combinaison ou non avec des méthodes d'immunocapture (c.-à-d. l'expression d'antigènes de surface) ou avec la PCR (ou ELISA), et ensuite on confirme les facteurs de virulence connus (les gènes *stx* et le gène *eae*, ou d'autres si souhaité) dans les isolats individuels du sérotype d'*E. coli* en question (voir annexe 1).

Ces deux approches de détection présentent toutefois des limites. En premier lieu, la détection moléculaire d'une combinaison de gènes de virulence dans les denrées alimentaires n'exclut pas que les gènes de virulence soient présents dans plusieurs souches d'*E. coli* qui, prises chacune séparément, sont peu ou pas pathogènes pour l'homme. Par

conséquent, une confirmation de la souche par isolation est nécessaire. L'isolation de la souche reste également importante pour la caractérisation de la souche: l'analyse d'autres facteurs de virulence possibles, pour la détermination du sérotype et du profil d'antibiorésistance, et pour leur comparaison moléculaire avec des souches cliniques au cours des foyers épidémiques. Ces informations sont nécessaires pour établir le lien entre la présence de la souche de VTEC dans la denrée alimentaire et la souche clinique chez l'homme. Deuxièmement, l'approche consistant à isoler le sérotype recherché est rendue difficile par la présence d'une flore compétitive dans l'aliment (souches différentes ou non d'*E. coli* non pathogènes, ou germes d'accompagnement étroitement apparentés comme d'autres *Enterobacteriaceae* ou des bactéries lactiques acidifiantes), ce qui empêche la croissance des souches d'*E. coli* pathogènes qui sont présentes en faibles nombres. Une troisième limite est le fait que déjà un nombre (très) peu élevé doit être identifié dans les denrées alimentaires en raison de la faible dose-infectieuse. C'est un facteur important pour lequel il faut tenir compte aussi bien des techniques moléculaires de screening que des méthodes de confirmation sur base d'immuno-capture ou isolement sélectif. En effet, cela nécessite des méthodes d'enrichissement équilibrées qui ne sont actuellement pas encore disponibles avec une sensibilité suffisante pour toutes les matrices (ex. graines germées). Enfin, bien que la PCR ait une forte sensibilité, il existe dans les aliments des inhibiteurs de la réaction qui peuvent être à l'origine de faux négatifs.

La souche la plus courante et la mieux étudiée de VTEC est l'*E. coli* O157. Ce pathogène peut être détecté de façon routinière parce que des méthodes ont été développées sur base de son séro-groupe. Le gène codant pour l'antigène O157 peut être détecté par PCR. Le séro-groupe peut également être détecté par ELISA (basée sur la réaction entre antigène et anticorps). Les souches peuvent aussi être isolées à partir de la denrée alimentaire via la liaison antigène-anticorps par des méthodes d'immuno-capture en combinaison avec des milieux sélectifs. Les milieux sélectifs profitent du fait que la plupart des *E. coli* O157 humaines sont sorbitol-négatives. Comme des souches sorbitol-positives d'*E. coli* O157 ont aussi été signalées, de tels milieux d'isolation sont également combinés à des milieux d'isolation chromogènes sélectifs qui permettent la différenciation d'*E. coli* O157.

Pour les autres séro-groupes du 'gang of five', on a aussi développé des méthodes de détection également basées sur la détection par PCR du gène codant pour le séro-groupe O en question ou via des méthodes d'immuno-capture. Toutefois, il nous manque ici, pour l'isolation de ces séro-groupes non O157, des milieux de gélose sélectifs différenciés prêts à l'emploi et d'utilisation aisée, ce qui rend les méthodes de détection assez compliquées (et souvent pas suffisamment sensibles et spécifiques).

Les VTEC pathogènes pour l'homme qui n'appartiennent pas au 'gang of five' ou ayant des facteurs de virulence alternatifs, peuvent échapper aux méthodes routinières actuelles qui sont basées sur la détection de la combinaison des gènes *stx* et du gène *eae*. Ce qui était le cas pour la souche d'*E. coli* O104:H4 qui était négative pour le gène *eae* et par conséquent, il a été nécessaire de développer pour cette souche une méthode d'isolation et de détection adaptée. Pour des pareils nouveaux sérotypes émergents de VTEC, une approche éventuellement alternative est nécessaire, établie ad hoc par étude de cas sur base des caractéristiques de la souche (ex. profil d'antibiorésistance, séquences spécifiques de la souche de VTEC concernée) (Beutin, 2011; AFSCA, 2011). Le fait qu'il n'y a pas assez d'informations disponibles sur l'identité des souches d'*E. coli* pathogènes pour l'homme est un facteur limitatif pour le développement d'une méthode de détection concluante. C'est pourquoi, les programmes de surveillance se limitent à la détection des organismes cibles prioritaires (certains séro-groupes connus et reconnus), pour lesquels des méthodes sont déjà disponibles pour la détection dans la chaîne alimentaire.

2.3. Quelles denrées alimentaires sont des produits à risque pour la contamination par des VTEC pathogènes pour l'homme?

Par traçage épidémiologique, le foyer épidémique d'*E. coli* O104:H4 en Allemagne et en France au printemps 2011 a été associé à des graines germées contaminées (EFSA, 2011). La production de pousses est un petit secteur, et les pousses sont commercialisées dans le monde entier. La température élevée et les conditions d'humidité du processus de production

favorisent la croissance rapide des bactéries (y compris des germes pathogènes) lorsque celles-ci sont présentes sur les graines germées. C'est ce qui explique le nombre de germes généralement élevé sur les pousses, ainsi que la possibilité de nombres accrus de germes pathogènes, même lorsque ceux-ci n'étaient présents sur les graines germées qu'en faibles nombres. Malgré le fait que les graines soient conservées au sec et parfois durant de longues périodes, on a constaté que les *E. coli* peuvent survivre longtemps sur ces graines germées (plusieurs mois) (Beuchat & Scouten, 2002; Van der Linden *et al.*, 2011). Ainsi, les graines germées constituent un produit à risque de VTEC en raison de leur contamination initiale éventuelle par des germes pathogènes, de leur processus de production et de leur consommation essentiellement crue. De même, elles ont déjà été à maintes reprises impliquées dans des foyers épidémiques d'origine alimentaire à grande échelle (notamment un foyer épidémique d'*E. coli* O157:H7 au Japon en 1996 suite à la consommation de germes de radis; au moins 30 foyers épidémiques aux Etats-Unis et au Canada depuis 1996 qui étaient liés à la consommation de pousses).

Un certain nombre de questions se posent concernant la production de graines germées: La qualité microbiologique des graines ou de l'eau utilisée lors de la production est-elle contrôlée? Est-il possible de décontaminer les graines et/ou l'eau? Les substrats ajoutés à l'eau pour promouvoir la germination et la croissance, constituent-ils un risque pour le consommateur? Les pousses peuvent-elles être lavées efficacement après la récolte en vue de la réduction d'une éventuelle contamination microbienne (y compris de germes pathogènes)? Dans un plus large contexte, le risque des processus de production des aliments végétaux frais crus "prêts à l'usage" (en tant que salade entière ou que produit coupé pré emballé) devrait être évalué de manière plus approfondie par rapport aux VTEC. Il est important que pendant le processus complet de production, les points d'attention et d'éventuelles mesures préventives et, le cas échéant, les phases d'intervention, soient identifiés et que leur maîtrise soit contrôlée et documentée. Une telle évaluation du risque a déjà été fortement développée pour les produits d'origine animale, mais de façon plutôt limitée pour les produits d'origine végétale. La mise en place de telles évaluations du risque doit faire apparaître si les processus de production doivent éventuellement être adaptés, ou comment ils peuvent être maîtrisés adéquatement. Cela permettrait de réduire le risque de contamination par des VTEC pathogènes et de multiplication et propagation pendant la phase de production.

Par analogie avec le foyer épidémique associé aux graines germées, il est important de prendre conscience des dangers d'autres denrées alimentaires potentiellement à la base de foyers épidémiques d'origine alimentaire causés par des entéropathogènes zoonotiques tels que les VTEC et la souche *E. coli* O104:H4. Les denrées alimentaires répondant à une ou plusieurs des descriptions ci-après peuvent représenter potentiellement un risque pour le consommateur:

- les produits 'prêts à l'emploi' qui sont consommés crus/frais (sans étape d'inactivation microbienne dans le processus de production ou en cours de préparation);
- les denrées alimentaires qui sont éventuellement un produit de niche (en ce qui concerne les volumes vendus) mais qui sont largement disséminées à partir d'un seul lot sur une grande région et qui sont éventuellement servies dans une grande diversité de repas comme petit élément (comme décoration ou assaisonnement);
- les denrées alimentaires ou matières premières qui sont soumises à de nombreuses manipulations manuelles pendant la récolte, la transformation ou la commercialisation ou qui peuvent être contaminées par d'autres sources, et qui sont ou non importées de pays tiers où les bonnes pratiques d'hygiène sont éventuellement moins bien connues et moins contrôlées ;
- les denrées alimentaires d'origine végétale en tant que résultat de l'internalisation des VTEC chez lesquelles l'enlèvement de VTEC par le lavage ou même une décontamination n'est plus possible.

Les denrées alimentaires ci-après sont des produits à risque pour la présence de VTEC pathogènes pour l'homme:

- le lait cru (ou insuffisamment cuit) et les produits laitiers à base de lait cru (ou insuffisamment cuit), comme le beurre, le fromage de chèvre, le fromage à pâte mi-dure, le fromage de brebis, le fromage frais, le fromage blanc et la crème;

- la viande bovine crue (ou insuffisamment cuite) comme le filet américain nature/préparé, ou la viande provenant d'autres (petits) ruminants (sauvages);
- les légumes à feuilles frais comme les laitues et les légumes-fruits comme les tomates, les poivrons et les concombres;
- les graines germées;
- les herbes (potagères) aromatiques fraîches;
- les fruits rouges tendres;
- les fruits, légumes et céréales prédécoupés et préemballés de la quatrième gamme.

Le Comité scientifique, sur base des connaissances actuelles, estime que le programme de contrôle actuel de l'AFSCA tient suffisamment compte de ces différents types de produits à risque de contamination par les VTEC pathogènes pour l'homme.

2.4. Dans quelle mesure le programme de contrôle de l'AFSCA peut-il détecter les VTEC pathogènes pour l'homme, et le système d'autocontrôle peut-il prévenir les foyers épidémiques de VTEC?

En Belgique, les sérogroupes de VTEC suivants figuraient dans le programme de contrôle de l'AFSCA: VTEC O157, O26, O103, O111 et O145. L'EFSA met en avant les sérogroupes de VTEC prioritaires suivants: O157, O26, O91, O103, O111 et O145 (EFSA, 2007). Aux Etats-Unis, l'accent a été mis récemment sur VTEC O157 et 'The Big Six' (= VTEC O26, O45, O103, O111, O121 et O145) (CDC, 2011). Le fait que tel ou tel sérotype soit ou non repris dans le programme de contrôle d'un pays donné est basé sur les informations dont on dispose concernant la prévalence régionale de ce sérotype dans la chaîne alimentaire et l'association de ce sérotype à des infections (graves), foyers épidémiques et SHU d'origine alimentaire. Ce sont surtout les sérotypes faisant partie des sérotypotypes A et B qui sont repris en priorité dans les programmes de contrôle de la chaîne alimentaire (voir tableau 1). Récemment, suite au foyer épidémique d'*E. coli* O104:H4 en Allemagne, l'attention a également été attirée sur l'*E. coli* O104:H4 dans l'Union européenne. L'*E. coli* O104:H4 n'appartient pas au sérotypotype A ou B, et la souche contenait une combinaison de facteurs de virulence qui n'avait pas encore été décrite comme cause d'un foyer épidémique d'origine alimentaire. Avant ce foyer épidémique, cette souche n'était pas dans le collimateur des programmes de contrôle de la chaîne alimentaire, ni même dans les laboratoires cliniques, elle était un sérotype relativement inconnu comme cause de CH et/ou de SHU.

Le Comité scientifique n'a pas de base scientifique directe pour recommander d'étendre le programme de contrôle de l'AFSCA en 2012 à la détection d'autres sérogroupes de VTEC par rapport aux sérogroupes recherchés en 2011, parce qu'il n'y a pas d'indications en provenance d'éventuels foyers épidémiques d'origine alimentaire ou de données cliniques recueillies d'infections individuelles de SHU en Belgique. En outre, nous ne disposons pas d'informations épidémiologiques pour décider, dans la vaste gamme de plus de 400 sérotypes de VTEC, lesquels constituent un risque élevé pour la santé publique. Il est évident que le screening visant plusieurs sérotypotypes de VTEC peut être intéressant en vue d'obtenir davantage d'informations concernant la présence de différents sérotypotypes dans la chaîne alimentaire. On recommande cependant bien d'étendre le nombre de sérotypotypes de VTEC dans le monitoring de l'AFSCA au moment où d'autres analyses ou notifications en provenance de la notification obligatoire démontrent que certains sérotypes méritent une attention renouvelée ou accrue dans la chaîne alimentaire. En même temps, le monitoring doit être étendu aux nouveaux sérotypotypes de VTEC lorsque des indications en provenance de laboratoires cliniques signalent que certains sérotypes avec certaines caractéristiques posent un problème significatif pour la santé publique.

La principale voie de contamination des denrées alimentaires par les VTEC est la contamination fécale par l'homme et l'animal (surtout via les fèces de ruminants). Ceci indique aussi l'importance de continuer à faire figurer les *E. coli* dans le programme de contrôle comme indicateur d'hygiène de contamination fécale, ceci en plus de l'analyse des VTEC. A terme, ces analyses peuvent éventuellement aussi être utilisées pour asseoir davantage la relation entre la présence (et les nombres) d'*E. coli* comme indicateurs d'hygiène, et les entéropathogènes.

Jusqu'à présent, dans le diagnostic alimentaire dans l'Union européenne, l'accent a été mis sur le screening quant à la présence de gènes *stx* et du gène *eae* (cf. CEN/TC 275/WG 6). La combinaison de la présence de ces facteurs de virulence et des sérogroupes prioritaires (à savoir le 'gang of five'), recommandée par l'EFSA (EFSA, 2007), entraîne la vigilance, la notification et éventuellement la prise d'actions correctives dans la chaîne alimentaire. La souche épidémique *E. coli* O104:H4 ne possède pas le gène *eae*, mais bien le gène *aafA* qui assure l'adhésion à l'épithélium intestinal et le gène régulateur *aagR* qui assure l'adhérence agrégative. On doit dès lors envisager de s'intéresser aussi, dans le monitoring de l'AFSCA, en plus de la présence des gènes *stx* et du gène *eae* ainsi qu'aux sérogroupes de VTEC prioritaires, à la présence de la combinaison d'autres facteurs de virulence pertinents, et ce sur la suggestion du Laboratoire National de Référence (LNR) pour les VTEC, du Laboratoire européen de Référence (EU-RL) pour les VTEC ou d'autres groupes de recherche spécialisés.

2.5. Quelles mesures additionnelles de maîtrise et de contrôle l'AFSCA peut-elle prendre pour prévenir les foyers épidémiques de VTEC?

La réalisation d'analyses microbiologiques sur les produits finis n'est pas une garantie pour la sécurité de la chaîne alimentaire en ce qui concerne les VTEC. Il y a, en effet, d'importantes restrictions qui sont inhérentes au plan d'échantillonnage. Surtout dans le suivi des germes pathogènes à très faible prévalence dans la chaîne alimentaire (< 1 %), de très grands nombres d'échantillons seraient nécessaires pour pouvoir émettre un jugement fiable quant au degré de contamination des denrées alimentaires en question. Par exemple, pour estimer la prévalence de l'*E. coli* O157 sur des produits de viande avec une fiabilité de 95 % et une précision de 0,05 %, la prévalence attendue étant de 0,5 %, il faut pas moins de 76.446 échantillons. De plus, les techniques de détection existantes ne sont pas assez sensibles et spécifiques pour détecter tous les sérogroupes à risque dans le large éventail de produits alimentaires qui sont mis sur le marché.

La maîtrise de la problématique des germes pathogènes dans la chaîne alimentaire devrait, par conséquent, faire l'objet d'une approche préventive via le système d'autocontrôle élaboré des secteurs concernés et devrait être contrôlée par l'AFSCA ou les organismes de certification. Le Comité scientifique recommande que l'AFSCA veille à l'application de bonnes pratiques d'hygiène et de travail, à la fois pendant la production animale, le processus d'abattage et la transformation des viandes et du lait (en raison de l'association historique des VTEC avec les produits animaux), et pendant la culture, la récolte, la transformation et la commercialisation des denrées alimentaires végétales crues (y compris les graines germées) qui sont consommées sans étape d'inactivation microbienne efficace (vu l'association croissante des VTEC avec les produits végétaux). Il faut souligner l'importance de l'hygiène personnelle et surtout de l'hygiène des mains du personnel actif à tous les stades de la chaîne alimentaire. Légalement, il est stipulé que les personnes entrant en contact direct avec des denrées alimentaires doivent prouver au moyen d'un certificat médical qu'aucun motif d'ordre médical n'empêche leur activité dans le secteur de l'alimentation. On se référera pour cela à l'arrêté royal du 3 février 2012 modifiant l'arrêté royal du 22 décembre 2005 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires, en ce qui concerne le certificat médical. Les personnes travaillant dans le secteur de l'alimentation ne peuvent, par conséquent, pas souffrir ou être porteur d'une maladie transmissible par les aliments. Dans certains cas, les personnes contaminées ne présentent pas de symptômes, et une maladie peut donc se propager discrètement. C'est pourquoi, le Comité scientifique estime que l'accent doit être mis sur la notion de 'mesures de précaution standard', autrement dit, chaque personne manipulant des denrées alimentaires doit respecter des règles d'hygiène, avec l'accent sur l'hygiène des mains/l'hygiène liée au passage aux toilettes.

Le Comité scientifique recommande d'étendre le guide sectoriel de la production primaire et le guide sectoriel de l'industrie de transformation des pommes de terre, fruits et légumes, à des recommandations spécifiques pour les produits à risque tels que les légumes à feuilles, les herbes potagères fraîches et les graines germées. Il est aussi recommandé de prévoir, au niveau de la production primaire végétale et de la transformation, un encadrement et une information suffisante concernant les dangers microbiologiques et les voies de transmission possibles à l'homme. Un exemple où cette connaissance est apportée de manière simple et

claire est le document “Five keys to growing safer fruits and vegetables” (WHO, 2011) (voir annexe 2). Enfin, le Comité scientifique estime que l'utilisation d'une eau d'une qualité microbiologique suffisante doit être un point d'attention particulier. La transmission des VTEC de l'eau d'irrigation aux légumes a déjà été constatée (Söderström *et al.*, 2008). Le transfert d'*E. coli* O157 par l'eau d'irrigation ou de lavage d'une qualité microbiologique insuffisante (et un nombre augmenté d'*E. coli* (O157)) est également possible et a été observé dans des études expérimentales (Luo *et al.*, 2011; Van der Linden *et al.*, 2011). Le transfert d'*E. coli* via l'eau de lavage peut être évité par l'addition de désinfectants (en tant qu'adjuvant technique) à l'eau de lavage. La désinfection de l'eau de lavage n'est toutefois pas une option pour éliminer efficacement les *E. coli* des légumes contaminés. Il ressort, en effet, d'une étude expérimentale que cela ne permet d'obtenir une réduction que de 0,5 à 1,0 log de contamination microbienne (Baert *et al.*, 2009; Keskinen & Annous, 2011; López-Gálvez *et al.*, 2009).

2.6. Quelle approche peut-on appliquer pour empêcher que des foyers épidémiques (inattendus) de VTEC s'aggravent en crise?

Pour identifier à temps un foyer épidémique de VTEC, le secteur médical a besoin d'une bonne communication entre les laboratoires cliniques, et d'un rapportage central rapide et efficace des cas de SHU chez l'homme, aussi en ce qui concerne les caractéristiques des isolats (virulence, sérotype, ...). Tous les cas de diarrhée sanglante et de SHU doivent être étudiés sur base de diagnostic microbiologique et, par conséquent, toutes les ressources qui rendent cela possible doivent être mises à la disposition du secteur médical. Cela permettra d'identifier plus rapidement les foyers épidémiques, même disséminés dans plusieurs régions.

On a besoin d'une bonne interaction et coordination et d'un échange adéquat d'informations entre les différents laboratoires de référence nationaux et européens pour l'analyse des VTEC dans les échantillons provenant de l'homme, de l'animal et des denrées alimentaires, ce qui permet de rassembler des informations sur la dissémination des souches de VTEC tant chez l'homme que dans la chaîne alimentaire. De même, une bonne diffusion de ces informations et connaissances est nécessaire aux autorités compétentes (AFSCA et Service Public Fédéral Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement) et au secteur agro-alimentaire, qui sont responsables de la sécurité de la chaîne alimentaire. Ce faisant, il faut suffisamment investir dans une étude épidémiologique adéquate afin d'établir le lien entre le rapportage clinique et les études de cas, et les denrées alimentaires potentiellement suspectes d'une infection alimentaire. A cet effet, il est nécessaire d'établir des fiches actualisées sur les pathogènes, reprenant les informations sur les caractéristiques du pathogène, les réservoirs possibles, les voies de transmission, les denrées alimentaires associées pertinentes et les foyers épidémiques d'origine alimentaire récemment rapportés (éventuellement associés à des voies ou denrées alimentaires atypiques).

En cas de foyer épidémique, les plans d'échantillonnage et les analyses nécessaires doivent être adéquatement coordonnés. Le Comité scientifique soutient l'actualisation et la vérification permanentes d'un plan de crise et de communication efficace, de telle sorte que toutes les parties concernées (autorités, laboratoires, centres de connaissances et secteurs concernés) puissent réagir et communiquer rapidement, de façon adéquate et en concertation, pour la détection précoce d'infections alimentaires par VTEC pathogènes pour l'homme. Pour le bon fonctionnement d'un plan de communication et de crise, il est important qu'il y ait une bonne interaction notamment entre:

- les laboratoires de référence et les laboratoires de référence internationaux ou laboratoires d'experts des établissements de recherche ou des universités (animal-homme-aliment);
- les laboratoires d'entreprise et les autorités (échange d'informations).

Le LNR pour les VTEC, le EU-RL pour les VTEC ou d'autres groupes de recherche spécialisés doivent développer des techniques moléculaires permettant d'opérer un screening rapide et efficace des cultures et isolats quant à la présence d'un large éventail de facteurs de virulence (voir 2.4.). Ces techniques moléculaires doivent comporter une gamme aussi large que possible des gènes de virulence connus et être disponibles au laboratoire de

référence. A côté de la détection des gènes de virulence connus, les techniques moléculaires pour sous-typage appropriées doivent aussi être développées (ex. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ou IS caractérisation). De cette façon, les cas individuels peuvent ou ne peuvent pas être liés à un foyer épidémique, et la source de contamination ou le secteur le plus probable (de l'alimentation) d'être contaminé peut aussi rapidement que possible être identifié(e). Des informations à partir de sous-typage devraient être intégrées aux données de surveillance. Il faut aussi prêter l'attention nécessaire au développement de meilleures méthodes de détection, en particulier dans des produits avec une haute charge microbiologique, comme une étape d'accumulation adéquate préalablement au screening au moyen, par exemple, de la PCR (voir 2.2.). Lorsque le germe pathogène (qui a souvent une faible dose infectieuse) peut se développer en nombres suffisants et que les gènes de virulence peuvent être détectés via les techniques moléculaires, l'isolation de cultures pures sera facilitée. De cette manière, en cas d'apparition d'un foyer épidémique, la source de contamination peut être détectée le plus vite possible, ce qui peut réduire le nombre de victimes de tels foyers épidémiques. En plus, les produits suspects peuvent ensuite être rapidement testés et désignés avec une grande fiabilité comme étant un agent suspect ou sûr.

3. Recommandations

Le Comité scientifique émet les recommandations suivantes:

Au monde scientifique de:

- poursuivre les études pour l'identification des facteurs de virulence et des sérotypes de bactéries *E. coli* pathogènes pour l'homme et causant le SHU;
- mener des recherches sur le spectre complet des facteurs de virulence possibles et nécessaires (ou de leurs variantes) et sur leurs mécanismes de régulation des VTEC pathogènes pour l'homme;
- réaliser une étude sur la dissémination du spectre potentiellement large de caractéristiques de virulence chez les VTEC pathogènes, tant pour l'homme que dans la chaîne alimentaire (y compris animaux et végétaux);
- poursuivre la recherche des réservoirs et des voies de transmission des sérotypotypes de VTEC connus;
- acquérir des connaissances sur la présence possible d'EAEC et/ou de leurs gènes d'adhésion typiques chez les souches d'*E. coli* humaines (tant sur des isolats d'*E. coli* de patients ayant des symptômes cliniques que de personnes en bonne santé), chez les souches d'*E. coli* provenant de réservoirs animaux et de la chaîne alimentaire (produits végétaux et animaux);
- entamer des recherches supplémentaires sur de nouveaux pathotypes basés sur une combinaison alternative de facteurs de virulence (ex. EAEC-VTEC) et dont la dissémination et la possibilité de survie dans la chaîne alimentaire sont inconnues;
- acquérir des connaissances sur l'apparement épidémiologique des VTEC, la relation évolutive entre les VTEC et l'homologie de leurs facteurs de virulence par rapport à d'autres groupes d'*E. coli* pathogènes;
- poursuivre la recherche pour suivre, comprendre et prédire l'évolution des souches de VTEC, et plus précisément des sérotypes non-O157:H7;
- mener des recherches sur la possibilité de croissance et de survie des différentes souches d'*E. coli* pathogènes pour l'homme dans la chaîne alimentaire, en vue d'acquérir des connaissances sur la persistance possible de tels germes dans la chaîne alimentaire;
- entamer des recherches sur les sérotypes de VTEC récemment identifiés qui sont décrits dans d'autres régions, dont seuls des cas sporadiques ont été notés ou pour lesquels une nouvelle technologie est connue;
- réaliser une étude sur l'effet et l'efficacité de stratégies d'intervention classiques (ex. procédures de lavage, nettoyage et désinfection, décontamination (y compris des graines) ou techniques de conservation (acidification, conditionnement, cuisson, etc.)) et sur l'efficacité de nouvelles mesures préventives d'hygiène dans le secteur des graines germées;

- développement des techniques moléculaires d'identification des facteurs de virulence des VTEC, y compris des méthodes de sous-typage et de fingerprinting, et avec l'intégration des informations acquises aux données de surveillance;
- optimisation des méthodes de culture et d'isolation des sérotypes de VTEC pathogènes pour l'homme, en particulier dans le champ d'application des échantillons avec une haute charge microbiologique avec la flore similaire secondaire.

A l'AFSCA de:

- évaluer le risque des processus de production des denrées alimentaires végétales crues fraîches 'prêtes à l'emploi';
- évaluer annuellement le programme de contrôle en ce qui concerne les VTEC pathogènes pour l'homme en fonction des connaissances à propos des sérotypotypes pathogènes pour l'homme en circulation;
- procéder à des contrôles sur la maîtrise de la contamination fécale via l'analyse d'*E. coli*, en parallèle avec les contrôles des VTEC dans la chaîne alimentaire, étant donné que seules celles-ci ne peuvent pas offrir une garantie;
- outre le screening de recherche de la présence de gènes *stx* et du gène *eae* et les sérogroupes de VTEC prioritaires, s'intéresser également à la présence de la combinaison de facteurs de virulence pertinents, et ce sur la suggestion du LNR pour les VTEC, du EU-RL ou d'autres groupes de recherche spécialisés;
- procéder à des contrôles sur l'hygiène générale;
- faire ajouter dans le guide sectoriel pour la production primaire et celui pour l'industrie de transformation des pommes de terre, fruits et légumes, les recommandations spécifiques sur les produits à risque comme les légumes à feuilles, les herbes aromatiques (potagères) fraîches et les graines germées;
- procurer des informations aux secteurs, entreprises et consommateurs concernant les mesures préventives à prendre et les bonnes pratiques de travail (ex. brochures pour les consommateurs avec la mention de l'importance d'une bonne hygiène des mains, informations sur le lavage des légumes, etc.);
- mener des recherches sur la nécessité d'établir des plans de communication et de crise spécifiques qui soient d'application en cas d'un foyer épidémique de VTEC.

Au secteur médical et aux différents laboratoires de diagnostic de:

- assurer une bonne communication entre les laboratoires cliniques et un rapportage central efficace et rapide des cas de SHU chez l'homme;
- étudier tous les cas de diarrhée sanglante et de SHU chez l'homme;
- assurer une bonne communication et un bon échange d'informations entre les laboratoires cliniques (médecine humaine), les laboratoires vétérinaires et les laboratoires de l'alimentation.

Pour le Comité scientifique,
Le Président,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert

Bruxelles, le 04/05/2012

Références

AFSCA, 2011. *E. coli* O104 dans les denrées alimentaires Version 2, méthode pour la recherche et l'isolement de EHEC O104, 09/06/2011. Disponible au lien suivant: <http://www.favv-afsca.be/laboratoires/laboratoiresagrees/notesdeservice/>.

Baert, L., Vandekinderen, I., Devlieghere, F., Van Coillie, E., Debevere, J., Uyttendaele, M., 2009. Efficacy of Sodium Hypochlorite and Peroxyacetic Acid To Reduce Murine Norovirus 1, B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on Shredded Iceberg Lettuce and in Residual Wash Water. *Journal of Food Protection* 72 (5), 1047-1054.

Beuchat, L.R., Scouten, A.J., 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seed. *Journal of Applied Microbiology* 92, 382-395.

Beutin, L., 2011. Outbreak with aggregative EHEC O104:H4 in Germany: Specific characteristics and search for possible sources. National Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Federal Institute for Risk Assessment, BfR.

Bugarel, M., Beutin, L., Fach, P., 2010 (a). Low-density macroarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (*nle* genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): a new approach for molecular risk assessment of STEC isolates. *Applied Environmental Microbiology* 76 (1), 203-211.

Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A., Fach, P., 2010 (b). Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *International Journal of Food Microbiology* 142 (3), 318-329.

Cassar, C.A., Ottaway, M., Paiba, G.A., Futter, R., Newbould, S., Woodward, M.J., 2004. Absence of enteroaggregative *Escherichia coli* in farmed animals in Great Britain. *Veterinary Record* 154 (8), 237-239.

CDC, 2011. *E. coli* VTEC non-O157 - USA: new regulatory ban on beef. *Centaur Global Network Information* Vol. 15, issue 143.

Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., Karmali, M.A., 2008. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Applied Environmental Microbiology* 74 (7), 2153-2160.

EFSA, 2007. Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards*.

EFSA, 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. *Scientific Report of EFSA*.

Herold, S., Karch, H., Schmidt, H., 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages – genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology* 294, 115-121.

ILSI Europe, 2011. The Enterobacteriaceae and their Significance to the Food Industry. ILSI Europe Report Series. Disponible au lien suivant: <http://www.ilsil.org/Europe/Documents/EP%20Enterobacteriaceae.pdf>.

Iyoda, S., Tamura, K., Itoh, K., Izumiya, H., Ueno, N., Nagata, K., Togo, M., Terajima, J., Watanabe, H., 2000. Inducible *stx2* phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. *FEMS Microbiology Letters* 191 (1), 7-10.

Jourdan-da Silva, N., Watrin, M., Weill, F.X., King, L.A., Gouali, M., Mailles, A., van Cauteren, D., Bataille, M., Guettier, S., Castrale, C., Henry, P., Mariani, P., Vaillant, V., de Valk, H.,

2011. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 among French tourists returning from Turkey, September 2011. *Eurosurveillance*, 17 (4). Disponible au lien suivant: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20065>.

Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B., 2003. Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (11), 4930-4940.

Keskinen, L.A., Annous, B.A., 2011. Efficacy of adding detergents to sanitizer solutions for inactivation of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 147, 157-161.

Konczy, P., Ziebell, K., Mascarenhas, M., Choi, A., Michaud, C., Kropinski, A.M., Whittam, T.S., Wickham, M., Finlay, B., Karmali, M.A., 2008. Genomic O island 122, locus for enterocyte effacement, and the evolution of virulent verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190 (17), 5832-5840.

López-Gálvez, F., Allende, A., Selma, M.V., Gil, M.I., 2009. Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 133, 167-171.

Luo, Y., Nou, X., Yang, Y., Algre, I., Turner, E., Feng, H., Abadias, M., Conway, W., 2011. Determination of Free Chlorine Concentrations Needed To Prevent *Escherichia coli* O157:H7 Cross-Contamination during Fresh-Cut Produce Wash. *Journal of Food Protection* 74 (3), 352-358.

Mellmann, A., Bielaszewska, M., Karch, H., 2009. Intrahost Genome Alterations in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 136, 1925-1938.

Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., Caprioli, A., 1998. Enterohemorrhagic, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (3), 840-842.

Piérard, D., De Greve, H., Haesebrouck, F., Mainil, J., 2012. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. *Veterinary Research* 43 (1), 13.

Scheutz, F., Nielsen, E.M., Frimodt-Møller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, J.P., Caprioli, A., 2011. Characteristics of the enterohemorrhagic Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Eurosurveillance* 16 (24), 19889.

Söderström, A., Osterberg, P., Lindqvist, A., Jönsson, B., Lindberg, A., Blide Ulander, S., Welinder-Olsson, C., Löfdahl, S., Kaijser, B., De Jong, B., Kühmann-Berenzon, S., Boqvist, S., Eriksson, E., Szanto, E., Andersson, S., Allestam, G., Hedenström, I., Ledet Muller L., Andersson, Y., 2008. A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease* 5 (3), 339-349.

Tzschoppe, M., Martine, A., Beutin, L., 2011. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat-vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 2011, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.009.

Uber, A.P., Trabulsi, L.R., Irino, K., Beutin, L., Ghilardi, A.C., Gomes, T.A., Liberatore, A.M., de Castro, A.F., Elias, W.P., 2006. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. *FEMS Microbiology Letters* 256 (2), 251-257.

Van der Linden, I., Cottyn, B., Vlaemynck, G., Baert, L., Uyttendaele, M., Heyndrickx, M., Maes, M., 2011. Overleving en virulentie van de zoönotische pathogenen *Salmonella* en *E. coli* O157 in serreteelt van botersla. FOD SALCOSLA project.

WHO, 2011. Five keys to growing safer fruits and vegetables: promoting health by decreasing microbial contamination. Trial edition for field testing, June 2011. Disponible au lien suivant: http://www.who.int/foodsafety/consumer/5keys_growing_trial_edition.pdf.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivantes :

D. Berkvens, C. Bragard, E. Daeseleire, P. Delahaut, K. Dewettinck, J. Dewulf, L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, K. Raes*, C. Saegerman, B. Schiffers, M.-L. Scippo*, W. Stevens*, E. Thiry, T. van den Berg, M. Uyttendaele, C. Van Peteghem

*: experts invités

Remerciements

Le Comité scientifique remercie la Direction d'encadrement pour l'Evaluation des risques et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé des membres suivants :

Membres du Comité scientifique	M. Uyttendaele (rapporteur), L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, H. Imberechts
Experts externes	G. Daube (ULg), J. Mainil (ULg), D. Piérard (VUB), I. Sampers (Howest)

Le Comité scientifique remercie P. Fach (ANSES) et M. Heyndrickx (ILVO) pour la *peer review* de l'avis.

Cadre légal de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 9 juin 2011.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de la présente version.

Annexes

Annexe 1: Flow diagram pour la détection des VTEC

Annexe 2: Five keys to growing safer fruits and vegetables: promoting health by decreasing microbial contamination (WHO, 2011)