



PUBLICATION DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE n° 8316

Profil de risque pour le Groupe *Bacillus cereus* dans les toxi-infections d'origine alimentaire: situation en Belgique et recommandations.

Janvier 2010

1. INTRODUCTION & CONSIDERATIONS GENERALES

1.1 Perspective générale

Bacillus cereus et, dans une moindre mesure, d'autres espèces de *Bacillus* sont responsables de toxi-infections d'origine alimentaire. La caractérisation récente de plusieurs mécanismes de pathogénicité a permis de développer des outils plus fins de diagnostic basés sur les facteurs de virulence. Des souches psychrotrophes sont de plus en plus souvent impliquées et certains variants semblent plus dangereux que d'autres. En conséquence, ce micro-organisme présente donc un risque plus important que ce qui a été précédemment décrit et ce, pour toute une série de denrées alimentaires (produits d'origine végétale tels que riz, céréales, pâtes, jus de fruits mais aussi pâtisseries et plats préparés).

Suite une demande formulée en juin 2007 par la DG4 du SPF « Santé publique », le CSS a donc jugé important et opportun que l'autorité compétente fixe des critères microbiologiques basés sur les dernières données disponibles pour protéger le consommateur. Il est d'ailleurs important de souligner que de nouvelles données scientifiques sur *Bacillus* sont désormais disponibles et qu'il y a lieu d'en tenir compte pour pouvoir sélectionner les options appropriées de gestion du risque.

1.2 Objectifs de la démarche entreprise

L'objectif de la démarche pro-active entreprise par le CSS est de soutenir scientifiquement des options de gestion de risque qui peuvent être prises par les autorités, comme par exemple, défendre la position belge dans le cadre de la fixation ou de la révision de critères au stade de la consommation et/ou dans la chaîne de production/transformation (critères dans le projet de règlement CE en cours, objectifs de performance au niveau du *Codex Alimentarius*) conformes à des objectifs de santé publique.

Ces recommandations visent aussi, en matière d'impact pour la santé publique, à préciser le niveau de protection le plus approprié pour le consommateur eu égard à ce germe et ce, afin de mieux appréhender la gestion de ces sources de toxi-infections d'origine alimentaire.

Dans la mesure du possible, la démarche menée s'inscrit au mieux dans les principes et la méthodologie d'évaluation de risques développée par le *Codex Alimentarius* et l'EFSA.

1.3 Méthodologie

Dès le départ, les experts du CSS ont considéré qu'il était indiqué d'élaborer une synthèse détaillée des données et de l'état des connaissances actuelles en ce qui concerne ce micro-organisme sur base de la littérature scientifique actuelle. Ce travail de fond de synthèse de la

situation a été réalisé en vue de l'élaboration d'un avis à l'attention des autorités compétentes (afin de répondre aux attentes et préoccupations spécifiques du SPF).

Pour ce faire, un sous-groupe spécifique d'experts en microbiologie alimentaire et en matière de *Bacillus* s'est réuni et a élaboré un rapport étendu en langue anglaise sur la problématique spécifique de *Bacillus* spp. dans les denrées alimentaires (cf. **Annexe**: « *Risk profile of the Bacillus cereus Group implicated in foodborne infections* »).

L'accent a été mis, entre autres, sur les toxines responsables des diarrhées et sur la toxine émétique comme facteurs de virulence. Un chapitre a été consacré à la classification, aux facteurs de croissance et aux méthodes de détection. Pour la classification des *Bacillus*, il est préférable de se baser sur les facteurs de virulence plutôt que sur la taxonomie. La problématique de la toxine céréulide a fait l'objet d'une attention toute particulière.

En Belgique, les données épidémiologiques sont peu nombreuses. La situation des Pays-Bas est par contre beaucoup plus étudiée (en raison des habitudes alimentaires). Disposer de plus de données au niveau national serait hautement intéressant (importance objective des toxi-infections annuelles dues à *B. cereus*).

Etant donné les nombreuses lacunes dans les connaissances scientifiques disponibles et nécessaires pour réaliser une évaluation formelle des risques, les experts du CSS ont plutôt opté pour une démarche de « *risk profile* » qui leur semble être plus appropriée que celle de l'approche quantitative propre à l'évaluation des risques. Le but est de rassembler les informations récentes, pratiques, concrètes et de pouvoir proposer ensuite une stratégie de maîtrise.

Il est également utile de souligner qu'au niveau européen (Règlement (CE) N°1441/2007 modifiant le Règlement (CE) N°2073/2005 relatifs aux critères microbiologiques), on se limite à proposer un critère d'hygiène des procédés (*process hygiene criteria*) dans le lait en poudre destiné aux nourrissons et aux très jeunes enfants. Au niveau européen, l'établissement de critères microbiologiques pour d'autres denrées alimentaires n'a pas reçu jusqu'à présent un support suffisant.

2. CONCLUSIONS DU RAPPORT DU CSS

A partir du profil de risque développé dans le rapport scientifique (repris en annexe) et les différents points mis en exergue dans ce document, les conclusions suivantes peuvent être tirées:

- La maîtrise du germe sporulant *Bacillus cereus* dans la chaîne alimentaire représente un défi dans la mesure où il s'agit d'un groupe de micro-organismes qui sont en général présents partout dans l'environnement et qui présentent une grande diversité génétique et phénotypique (souches émétiques et diarrhéiques; souches mésophiles, psychrotolérantes et thermotolérantes) et où les catégories de denrées alimentaires concernées sont très hétérogènes.
- Les spores, formes de survie de *B.cereus* sont aussi capables de germination (cellules végétatives) et ensuite de croissance et de production de toxine durant le stockage de certains types de denrées alimentaires, parmi lesquels principalement les denrées alimentaires modérément réchauffées avec stockage au frais et les aliments déshydratés avant reconstitution ou réhydratation.
- Bien qu'un niveau de contamination d'au moins 10^4 UFC (unités formant colonie) par ml ou par gramme de denrée alimentaire soit considéré comme potentiellement dangereux, des données critiques pour définir le niveau exact d'UFC susceptibles de causer une toxi-infection alimentaire font actuellement défaut. L'apparition de symptômes n'est pas uniquement liée au nombre de *B.cereus* présents mais à la conjonction de trois variables qui jouent un rôle équivalent: le contexte génétique de la souche (pathotypes) de *B.cereus*, la denrée alimentaire (type et conditions de conservation) et l'hôte (ingérant la denrée alimentaire contaminée).
- La production des toxines est non seulement influencée par les caractéristiques génétiques de chaque souche, mais également par son environnement immédiat (dont les matrices alimentaires). Cependant, les mécanismes régulateurs de la production des entérotoxines (symptôme diarrhéique) ou de la toxine céréulide (symptôme émétique) ne sont qu'insuffisamment connus à ce jour.
- Les souches psychrotolérantes de *B.cereus* (actuellement renommées en *Bacillus weihenstephanensis* pour la majorité de ces souches) sont les plus fréquentes en tant que contaminants alimentaires alors que les souches mésophiles sont principalement responsables du déclenchement d'une toxi-infection alimentaire. Toutefois, la découverte récente de souches émétiques psychrotolérantes impose la plus grande vigilance. L'importance des souches psychrotolérantes dans les toxi-infections alimentaires doit faire l'objet d'études complémentaires.
- Par ailleurs, il n'y a pas d'indication qu'un pathotype diarrhéique particulier du groupe *B. cereus* soit, ou devienne, prépondérant dans les épisodes de toxi-infections alimentaires.
- Sachant qu'une souche de *B. cereus* peut produire de multiples toxines, il est essentiel de développer les connaissances concernant la prévalence de gènes de toxines parmi d'autres souches et espèces du groupe *B. cereus*.
- Ces dernières années, les connaissances sur les souches émétiques de *B. cereus* ont permis le développement des premières méthodes de détection. Par contre, pour les entérotoxines diarrhéiques, la recherche est entravée par le manque de méthodes de détection qualitative et quantitative, fiables et reproductibles.
- Lors d'un incident épidémique (*outbreak*), il est essentiel que des méthodologies d'analyse microbiologiques et moléculaires soient appliquées, quel que soit le type de symptôme, aux différentes colonies extraites du milieu d'isolement. Des milieux de culture et des tests spécifiques doivent être développés afin de pouvoir isoler ou identifier les patho- et phénotypes

importants.

- Plus fondamentalement encore, il faut rappeler que la taxonomie du groupe *B. cereus* est très complexe, ce qui complique fortement l'identification des espèces appartenant à ce groupe (entre autres *B. cereus* et *B. weihenstephanensis*). De plus, la définition et la détermination des génotypes, pathotypes et phénotypes sont importantes.

- Il est absolument indispensable que les *Good Manufacturing Practices* (GMP) et l'HACCP soient correctement appliqués dans les processus de production afin de limiter la présence de *B.cereus* dans les denrées alimentaires à risque (entre autres les denrées alimentaires pasteurisées ou cuites et refroidies ou les aliments déshydratés).

- Compte tenu de l'obligation pour les opérateurs de mettre en place des systèmes de management de la sécurité alimentaire, il est important que ces opérateurs établissent un plan d'évaluation pour *B.cereus* en tant que risque microbiologique dans certaines denrées alimentaires. Pour surveiller correctement *B.cereus*, il est indispensable de pouvoir vérifier et valider l'efficacité des mesures de contrôle.

- Actuellement, le système de management le plus efficace pour contrôler *B.cereus* dans la chaîne alimentaire semble être le respect strict des températures basses ($\leq 7^{\circ}\text{C}$) tout au long de la chaîne (processus, stockage, transport) par les différents opérateurs (producteur, grossiste, détaillant) et le consommateur.

- Il est expressément conseillé – particulièrement pour les souches émétiques – que les produits cuits ne soient pas conservés en dehors du réfrigérateur ou stockés pour une courte période à des températures inadaptées ($>10^{\circ}\text{C}$). Afin de prévenir la croissance des souches émétiques, il est essentiel d'abaisser rapidement la température des produits précuits par des refroidissements séparés.

- Lors du stockage et de la conservation de denrées alimentaires, la croissance de *B.cereus* peut être inhibée par la production de denrées alimentaires à pH non-neutre ou par le développement de formulations alimentaires conformes à la *hurdle technology*. De plus amples recherches à ce sujet sont nécessaires.

- En écho au Règlement de la Commission 1441/2007 amendant le Règlement 2073/2005, il faut savoir que les produits alimentaires destinés aux nourrissons doivent être considérés comme étant à haut risque (compte tenu de la croissance de *B.cereus* dans ce type de produits et les spécificités de ce groupe de consommateurs).

- Contrairement à l'évaluation scientifique réalisée par l'EFSA en matière d'utilisation de probiotiques dans l'alimentation animale, il n'existe actuellement pas de réglementation spécifique pour l'utilisation de *B.cereus* comme probiotique en alimentation humaine. Des démarches préparatoires dans ce sens (recommandations scientifiques et encadrement législatif) sont encouragées.

3. SITUATION EN BELGIQUE

B. cereus en tant que pathogène d'origine alimentaire pour l'homme.

B. cereus est largement répandu dans l'environnement; il fait partie d'un groupe d'espèces sporulantes apparentées, communément connu sous le nom de groupe *B. cereus*. Les espèces suivantes appartiennent à ce groupe: *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* et *B. pseudomycoides*.

B. cereus est un pathogène d'origine alimentaire qui peut être à l'origine de deux pathologies distinctes lors de la consommation de mets contenant notamment des féculents, du riz, du lait, des purées de légumes ou des aromates et ce, en raison de l'existence de différentes toxines: une de type émétique et une série d'autres de type diarrhéique (Granum, 1997). Un effet aigu d'intoxication, qui se manifeste sous forme de nausées et de vomissements (type émétique), est provoqué par l'ingestion de la toxine céréulide (dose d'intoxication d'environ 8 µg/kg de poids corporel) généralement produite dans les féculents (pâtes et riz).

Il est par ailleurs suggéré que les symptômes diarrhéiques (durée d'incubation de 6 à 18h) apparaissent lors de l'ingestion de nourriture contaminée par un grand nombre de spores de *B. cereus* ou de cellules végétatives (10^3 - 10^5 unités formant colonies par gramme) et que la formation de toxines apparaît durant la germination et la croissance végétative dans l'intestin grêle (EFSA, 2005). En ce qui concerne la relation dose/réponse pour cette toxi-infection, des données précises sont encore manquantes.

Bien que les intoxications alimentaires par *B. cereus* provoquent souvent des symptômes aigus (vomissement ou diarrhée), leur gravité est généralement considérée comme modérée en raison du caractère souvent auto-limitatif. Le nombre d'épisodes rapportés constitue donc clairement une sous-estimation du problème de santé publique. Cependant, il est maintenant établi que le type émétique peut, dans certains cas, connaître une issue fatale (entre autres par décompensation aiguë hépatique {Dierick, 2005}).

En Belgique, 22 épisodes de *B. cereus* d'origine alimentaire (dont 13 de type diarrhéique) ont été rapportés au cours des 6 dernières années, soit 386 personnes malades, 21 hospitalisations et 3 décès (K. Dierick – ISSP, com. pers., 2009).

Il existe une discordance en ce sens que les autorités de santé publique font une nette distinction entre *B. cereus* s.s., comme pathogène de classe 2 susceptible de provoquer une intoxication alimentaire, et les autres espèces du groupe *B. cereus*, alors que la méthode standard ISO 7932 internationalement acceptée et d'autres méthodes de routine ne peuvent pas faire de distinction entre les différentes espèces du groupe *B. cereus*.

Les toxines de B. cereus: structure, détection, apparition et formation

Le céréulide est une petite toxine peptidique cyclique, thermostable et résistante à un pH extrême et à l'activité protéolytique gastrique. De ce fait, elle parvient dans l'intestin sans perdre de son activité biologique. Elle est produite par un groupe clonal spécifique de souches mésophiles de *B. cereus* lorsque des produits, principalement féculents (plats de riz ou de pâtes), sont conservés à une température inadéquate (conservation entre 10-30°C) (Carlin *et al.*, 2006). Très récemment, la production de céréulide a été aussi observée chez des souches psychrotrophes de *B. weihenstephanensis* (Hoton *et al.*, 2009). Cette toxine ne peut pas être détectée par procédé immunologique mais il existe depuis peu des tests quantitatifs parmi lesquels un test de mobilité sur sperme de verrat (Rajkovic *et al.*, 2006b). Par PCR, il est possible de détecter le gène responsable codant pour la peptide synthétase (*ces*) qui est localisé sur un plasmide (Hoton *et al.*, 2005; Ehling-Schulz *et al.*, 2005).

En outre, une grande partie des souches de *B. cereus* peuvent produire des toxines provoquant la diarrhée (Ehling-Schulz *et al.* 2006). On trouve notamment l'hémolysine BL (HBL) consistant en 3 composants protéiques, B, L₁ et L₂ (encodés par les gènes *hbIC*, *hbID* et *hbIA* situés sur un

même opéron), tous trois indispensables à une activité toxique maximale. Le complexe entérotoxique non hémolytique, ou Nhe, est composé lui aussi de trois protéines (encodées par les gènes *nheA*, *nheB* et *nheC* localisés aussi sur un même opéron) qui sont toutes trois nécessaires pour une activité entérotoxique complète est également largement répandu (Swiecicka *et al.* 2006). Les toxines diarrhéiques sont thermolabiles et sont inactivées dans l'estomac par un pH acide et les enzymes protéolytiques. De ce fait, l'ingestion de ces toxines par l'intermédiaire de l'alimentation ne joue, en principe, qu'un très faible rôle. Par contre, la formation de ces entérotoxines dans l'intestin grêle provoque des symptômes diarrhéiques.

Outre la détection par PCR des gènes correspondants, il existe des tests commerciaux pour les deux toxines diarrhéiques (BCET RPLA test de Oxoid[®] pour la toxine Hbl et BDE ELISA de Tecra[®] pour la toxine Nhe). Dans les deux cas, seul un des trois composants protéiques est détecté de manière qualitative uniquement et pour le dernier test une réactivité croisée est également signalée. Ceci limite fortement la valeur de ces tests (notamment Moravek *et al.*, 2006).

Des anticorps monoclonaux pour l'entérotoxine HBL ou Nhe sont décrits (e.a. Dietrich *et al.*, 2005), mais ne sont pas disponibles librement ou sous forme commerciale. Outre ces deux complexes entérotoxiques, il est également question d'une entérotoxine T (*bceT*), une cytotoxine K (*cytK*) et une entérotoxine FM (*entFM*). La démonstration de l'implication dans une intoxication alimentaire uniquement de la cytotoxine K (codée *cytK*) – une protéine simple – a été apportée par un épisode alimentaire très grave avec issue fatale (Lund *et al.*, 2000). Entre-temps, deux formes, CytK₁ et CytK₂, ont été décrites; la première étant très toxique pour les cellules épithéliales humaines et la deuxième étant généralement plus fréquente (Fagerlund *et al.*, 2004).

En ce qui concerne la protéine cytotoxine K, aucune méthode de détection n'est encore décrite.

Il ressort d'une étude récente sur 411 souches de *B. cereus* et 205 souches de *B. thuringiensis* (d'origine alimentaire ou provenant du sol) que dans 65 % des souches, les huit gènes toxiques mentionnés ci-dessus (*hbl* et *nhe* operon, *cytK*, *entFM*) étaient tous présents et que l'opéron *hbl* était significativement plus souvent présent chez *B. thuringiensis* (86 %) que chez *B. cereus* (66 %). Par contre, pour les autres gènes toxiques, il n'existait aucune différence significative et tant l'opéron *nhe* que le gène *entFM* étaient présents dans toutes les souches étudiées alors que le gène *cytK* n'était présent que dans 83 à 89 % des souches (Ngamwongsatit *et al.*, 2008). En revanche, seul un très petit nombre de souches étaient positives pour la production du céréulide (p. ex. 8 % dans l'alimentation aux Pays-Bas (Wijnands *et al.*, 2006a) ou encore 1 à 2 % dans une collection de plus 2.000 souches (Hoton *et al.*, 2009)). En outre, les gènes des entérotoxines de *B. cereus* montrent un taux élevé de polymorphisme (Ehling-Schulz *et al.*, 2006).

La seule présence de gènes de toxines n'est pas suffisante, du moins en ce qui concerne les entérotoxines, pour prédire le caractère pathogène de la souche: celui-ci dépend dans une large mesure du contexte génétique de la souche et des conditions environnementales. C'est ainsi que de grandes différences ont été constatées dans la production de composants toxiques HBL-L₂ et NheB: les souches provenant d'intoxications alimentaires produisaient en moyenne significativement plus de NheB que les souches alimentaires/environnementales (Moravek *et al.*, 2006). Le niveau de production de Nhe pourrait en partie expliquer l'activité cytotoxique de *B. cereus* et pourrait constituer une indication d'un haut potentiel diarrhéique.

La régulation de la formation d'entérotoxines est très complexe, dans la mesure où elle implique divers régulateurs transcriptionnels. L'expression des gènes d'entérotoxines codant pour Nhe, HBL et CytK est fortement régulée par le système *quorum sensing* PlcR-PapR (Gohar *et al.*, 2008), mais pour Nhe et HBL, leurs régulations dépend également d'autres systèmes liés à l'environnement tels que les régulateurs redox ResDE et Fnr (Duport *et al.*, 2006; Zigha *et al.*, 2007), qui régulent également la croissance fermentative de *B. cereus* et pourraient à tout le moins partiellement fonctionner indépendamment de PlcR. Par ailleurs, l'expression des opérons

hbl et *nhe* semble être freinée par le régulateur catabolique CcpA, qui contrôle également le métabolisme glucosique (van der Voort *et al.*, 2008). Ces données correspondent à la double constatation que aussi bien la vitesse de croissance que la source de glucides influencent la production d'entérotoxines, le sucrose augmentant notamment la production de Nhe (Ouhib *et al.*, 2006), et que le faible potentiel redox stimule la production d'entérotoxines (surtout HBL) (Zigha *et al.*, 2006).

Le groupe *B. cereus*: taxonomie et diversité

La taxonomie du groupe *B. cereus* est complexe et controversée car les caractéristiques phénotypiques discriminantes entre les différentes espèces ne sont pas stables et leurs déterminants génétiques peuvent être échangés, y compris au sein de matrices alimentaires (Van der Auwera *et al.*, 2007). Pour des raisons cliniques ou économiques, les espèces distinctes sont actuellement maintenues. Depuis 1998, *B. weihenstephanensis* a été ajouté au groupe *B. cereus* afin d'inclure les souches psychrotolérantes (croissance encore sous 7°C) dans une espèce séparée. Il est ensuite apparu que toutes les souches psychrotolérantes ne faisaient pas systématiquement partie de cette espèce et qu'une souche spécifique de *B. weihenstephanensis* était hautement cytotoxique, du moins *in vitro* (Stenfors & Granum, 2001). Dans le cadre d'une chaîne alimentaire réfrigérée, les souches psychrotolérantes peuvent avoir des implications économiques néfastes (Thorsen *et al.*, 2009; Arnesen *et al.* 2007; Valero *et al.* 2007). Le développement d'une alimentation de confort (plats traités au minimum avec durée de conservation prolongée au réfrigérateur) peut créer une niche pour ce type de souches psychrotolérantes.

La question est dès lors de savoir si ces souches psychrotolérantes, vu leur croissance plus lente à 37°C (température de l'intestin grêle) constituent un risque important d'intoxication alimentaire. Pour ce faire, il faudrait connaître quel est le niveau de contamination par cette flore psychrotolérante (flore contaminante des produits conservés réfrigérés) qui est acceptable dans le cadre de la santé publique. Dans un système modélisant le passage de spores par l'estomac et la germination/croissance dans l'intestin grêle, il est apparu que les souches mésophiles de *B. cereus* présentent une germination et une croissance meilleure que les souches psychrotolérantes dans le milieu de simulation reproduisant l'intestin grêle (Wijnands *et al.* 2006b). Le type d'alimentation et la spécificité de la souche semblent également avoir un rôle à jouer dans la croissance et la production d'HBL dans les simulateurs d'intestin grêle (Clavel *et al.*, 2007). Dans de futures études à mener en simulateurs d'intestin grêle, il faudrait également étudier l'influence du nombre de germes, des espèces en présence, de leurs pathotypes et de leur potentiel de production des différentes entérotoxines et, finalement, tenir compte de l'écologie spécifique dans le tractus gastro-intestinal (microbiotes compétitifs et conditions anaérobies).

Il ressort d'une étude récente de la composition des populations que le groupe *B. cereus* peut être subdivisé en sept grands groupes génétiques correspondant à des écotypes sur base d'habitats et/ou de limites de température pour la croissance et susceptibles de posséder un potentiel pathogène différent: c'est ainsi que les souches psychrotolérantes sont réparties en deux groupes génétiques mais avec une distribution inégale des isolats provenant d'intoxications alimentaires (Guinebrière *et al.*, 2007).

Cette division génétique peut constituer la base pour la définition de pathotypes (c.-à-d. les souches ou types qui représentent un danger pour la santé publique); pour ce faire, une caractérisation plus poussée (notamment du point de vue de la diversité des gènes toxiques et de leurs régulateurs) est nécessaire. A un stade ultérieur, une méthodologie de détection spécifique de ces pathotypes pourrait être envisagée.

Présence de *B. cereus* dans les denrées alimentaires

B. cereus produit des spores thermorésistantes qui survivent aux opérations de chauffage (pasteurisation) ou de déshydratation dans l'industrie alimentaire et qui, en raison de leur caractère hydrophobe, peuvent former ou initier des biofilms durant les étapes du processus. La pasteurisation stimule les spores à germer et, dans des circonstances favorables (p. ex. la réhydratation) à croître à nouveau sous forme de cellules végétatives. Par l'élimination des microbiotes non thermorésistants présents, les germes sporulants ont même un avantage compétitif dans les denrées alimentaires traitées par la chaleur. Une conservation prolongée au réfrigérateur de produits et denrées traités par la chaleur entraîne en outre une croissance spécifique des souches psychrotolérantes. Par conséquent, les denrées alimentaires chauffées telles que les produits laitiers pasteurisés, les plats de riz chinois et ce qu'on appelle les REPFED's (*Refrigerated Processed Foods of Extended Durability*) dont font partie les préparations réfrigérées précuites et les repas prêts à consommer, les produits déshydratés tels que l'alimentation pour nourrissons, les épices et aromates, les soupes et champignons déshydratés, le riz, les céréales et les pâtes de même que les fruits et légumes préemballés, dont les graines germées, constituent des produits à haut risque.

Exception faite pour les préparations en poudre pour nourrissons et pour les aliments diététiques en poudre destinés à des utilisations médicales spécifiques pour nourrissons âgés de plus de six mois (critère d'hygiène des procédés du Règlement (CE) N°1441/2007), il n'existe encore aucun critère microbiologique légal pour *B.cereus* dans ces denrées alimentaires à risque.

4. PERSPECTIVES ET PREMIERES RECOMMANDATIONS POUR LA RECHERCHE

Le Conseil Supérieur de la Santé attire l'attention des autorités compétentes sur les nombreuses lacunes et connaissances manquantes concernant *B. cereus* et sur les perspectives de projets de recherche permettant d'apporter une réponse aux nombreux manquements qui y sont soulevés:

- **la toxine céréulide et les entérotoxines:** promouvoir les recherches nécessaires pour déterminer de façon précise la relation dose/réponse dans le cadre des toxi-infections;
- **le sous-rapportage:** mettre sur pieds une méthodologie permettant la détermination précise de l'espèce appartenant au groupe *B. cereus* s.s. à laquelle appartient le *Bacillus* impliqué dans un épisode de toxi-infection alimentaire déclarée;
- **la validité des tests** (réactivité croisée): promouvoir et favoriser au niveau national la recherche afin de développer des tests permettant la détection et la discrimination des entérotoxines;
- **les composants toxiques (tels que NheB):** élaborer des protocoles de recherche permettant de les quantifier (caractériser les souches à haut potentiel diarrhéique et les différencier des souches environnementales);
- **les régulateurs transcriptionnels** (sucres, potentiel redox): développer et affiner les connaissances actuelles (afin de pouvoir éventuellement mettre en place des mesures préventives);
- **l'évaluation du risque:** déterminer le niveau maximum de contamination par la flore psychrotolérante (flore contaminante des produits conservés réfrigérés) qui permet de réduire le risque à un niveau acceptable pour la santé publique;
- **l'influence de l'écologie intestinale sur l'expression différentielle des entérotoxines:** promouvoir les études visant à mieux comprendre l'écologie de *B. cereus*, et en particulier de ses pathotypes diarrhéiques, au sein du système digestif, par l'utilisation de fermenteurs simulant l'intestin grêle humain. Ces approches permettront d'évaluer le potentiel de production des différentes endotoxines en fonction de paramètres comme la densité et la diversité microbienne ou les conditions physico-chimiques rencontrées dans l'intestin;
- **les pathotypes:** promouvoir des recherches visant à mieux caractériser la diversité génétique des souches et/ou des pathotypes de *B. cereus* qui représentent un danger pour la santé publique. Une méthodologie de détection et de discrimination de ces pathotypes devrait voir le jour à moyen terme;
- œuvrer à la détermination d'un **critère microbiologique de sécurité alimentaire** pour *B. cereus* dans les denrées alimentaires à risque sur base des nouvelles données scientifiques disponibles.

5. REFERENCES

- Arnesen L, O'Sullivan K., Granum P. Food poisoning potential of *Bacillus cereus* strains from Norwegian dairies. *Int. J. Food Microbiol* 2007;116: 292-96.
- Carlin F, Fricker M, Pielaat A, Heisterkamp S, Shaheen R, Salonen MS, et al. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol* 2006; 109(1-2):132-8.
- Clavel T, Carlin F, Dargaignaratz C, Lairon D, Nguyen-The C, Schmitt P. Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. *J Appl Microbiol* 2007; 103(5):1568-75.
- Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, et al. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8):4277-9.
- Dietrich R, Moravek M, Burk C, Granum PE, Martlbauer E. Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(12):8214-20.
- Duport C, Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol* 2006; 188(18):6640-51.
- EFSA - European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs *The EFSA J* 2005; 175:1-48.
- Ehling-Schulz M, Fricker M, Grallert H, Rieck P, Wagner M, Scherer S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol* 2006; 6:20.
- Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Martlbauer E, et al. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(1):105-13.
- Fagerlund A, Ween O, Lund T, Hardy SP, Granum PE. Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 2004; 150(Pt 8):2689-97.
- Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Okstad OA, Gominet M, et al. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 2008; 3(7):e2793.
- Granum PE. *Bacillus cereus* In: M. Doyle M, Beuchat L, Montville T, editors. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington D.C.: ASM Press; 1997. p. 327-36.
- Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol* 2008; 10(4):851-65.

- Hoton F, Fornelos N, N'Guessan E, Hu X, Swiecicka I, Dierick K, et al. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environ Microbiol Rep* 2009; 1:177-83.
- Hoton FM, Andrup L, Swiecicka I, Mahillon J. The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* 2005; 151(Pt 7):2121-4.
- Lund T, De Buyser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 2000; 38(2):254-61.
- Moravek M, Dietrich R, Buerk C, Broussolle V, Guinebretiere MH, Granum PE, et al. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 257(2):293-8.
- Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, et al. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int J Food Microbiol* 2008; 121(3):352-6.
- Ouhib O, Clavel T, Schmitt P. The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. *Curr Microbiol* 2006; 53(3):222-6.
- Rajkovic A, Uyttendaele M, Deley W, Van Soom A, Rijsselaere T, Debevere J. Dynamics of boar semen motility inhibition as a semi-quantitative measurement of *Bacillus cereus* emetic toxin (Cereulide). *J Microbiol Methods* 2006; 65(3):525-34.
- Royaume de Belgique. Arrêté Royal du 3 janvier 1975 relatif aux denrées et substances considérées comme déclarées nuisibles. MB du 3 janvier 1975
- Stenfors Arnesen LP, O'Sullivan K, Granum PE. Food poisoning potential of *Bacillus cereus* strains from Norwegian dairies. *Int J Food Microbiol* 2007; 116(2):292-6.
- Stenfors LP, Granum PE. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 197(2):223-8.
- Swiecicka I, Van der Auwera GA, Mahillon J. Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microb Ecol* 2006; 52(3):544-51.
- Thorsen L, Budde BB, Henrichsen L, Martinussen T, Jakobsen M. Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *Int J Food Microbiol* 2009; 134(1-2):133-9.
- UE - Union Européenne. Règlement (CE) n° 178/2002 établissant les prescriptions générales de la législation alimentaire, en particulier les articles 6 (analyse des risques) et 14 (prescriptions relatives à la sécurité des denrées alimentaires).
- UE - Union Européenne. Projet de critère microbiologique européen concernant *Bacillus cereus* présumé dans les aliments en poudre pour nourrissons. (Règlement (CE) N°1441/2007 modifiant le Règlement (CE) N°2073/2005 relatifs aux critères microbiologiques). 2007.
- Valero M, Hernandez-Herrero LA, Giner MJ. Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. *Food Microbiol* 2007; 24(7-8):671-7

- Van der Auwera GA, Timmery S, Hoton F, Mahillon J. Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *Int J Food Microbiol* 2007; 113(2):164-72.
- van der Voort M, Kuipers OP, Buist G, de Vos WM, Abee T. Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiol* 2008; 8:62.
- Wijnands LM, Dufrenne JB, Rombouts FM, in 't Veld PH, van Leusden FM. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. *J Food Prot* 2006; 69(11):2587-94.
- Wijnands LM, Dufrenne JB, Zwietering MH, van Leusden FM. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *Int J Food Microbiol* 2006; 112(2):120-8.
- Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch Microbiol* 2006; 185(3):222-33.
- Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J Bacteriol* 2007; 189(7):2813-24.

6. ANNEXE

“Risk profile of the *Bacillus cereus* Group implicated in foodborne infections”

Ont participé à la rédaction du rapport scientifique: Andreja Rajkovic, Mieke Uyttendaele*, Katelijne Dierick*, Simbarashe Samapundo, Jean-Jacques Dubois, Georges Daube*, Jacques Mahillon* & Marc Heyndrickx*.

La tâche de rapporteur centralisateur a été assurée par Mr Marc HEYNDRICKX.

Ce rapport scientifique est en attente de publication dans deux revues scientifiques. Durant le délai précédent cette parution, ce rapport est uniquement consultable physiquement dans les locaux du CSS. Après publication, ce rapport scientifique sera annexé à ce document.

7. COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Tous les experts ont participé *à titre personnel* au groupe de travail. Les noms des experts du CSS sont annotés d'un astérisque *.

Les experts suivants ont participé à l'approbation de cet avis:

| | |
|--------------------|--|
| DAUBE Georges* | (Microbiologie des aliments; ULg) |
| DE SCHRIJVER Koen* | (Epidémiologie; UA) |
| DE ZUTTER Lieven* | (Microbiologie des aliments; UGent) |
| DIERICK Katelijne | (Microbiologie des aliments; WIV-ISP) |
| GEERAERD Annemie* | (Microbiologie des aliments; KULeuven) |
| HEYNDRICKX Marc* | (Microbiologie des aliments; ILVO) |
| HOUF Kurt* | (Microbiologie des aliments; UGent) |
| MAHILLON Jacques* | (Microbiologie; UCL) |
| MELIN Pierrette* | (Microbiologie médicale; ULg) |
| MICHELIS Chris | (Microbiologie des aliments; KULeuven) |
| NOIRFALISE Alfred* | (Toxicologie et bromatologie; ULg) |
| PIERARD Denis* | (Microbiologie médicale; VUB) |
| RAJKOVIC ANDREJA | (Microbiologie des aliments; UGent) |
| SINDIC Marianne* | (Microbiologie des aliments; Gembloux Agro-Bio Tech) |
| THIRY Etienne* | (Virologie vétérinaire; ULg) |
| UYTTENDAELE Mieke* | (Microbiologie des aliments; UGent) |

L'administration est représentée par Benoît HORION et Isabel DE BOOSERE.

Le groupe de travail a été présidé par Georges DAUBE et le secrétariat scientifique a été assuré par Jean-Jacques DUBOIS.