



PUBLICATIE VAN DE HOGE GEZONDHEIDSRAAD nr. 8316

Risico-profiel voor *Bacillus cereus* Groep in voedsel toxi-infecties: situatie in België en aanbevelingen.

Januari 2010

1. INLEIDING & ALGEMENE OVERWEGINGEN

1.1 Algemeen perspectief

Bacillus cereus en in mindere mate andere *Bacillus*-species zijn verantwoordelijk voor voedseltoxi-infecties. Dankzij de recente karakterisering van meerdere pathogene mechanismen konden er verfijnder diagnose-instrumenten ontwikkeld worden, gebaseerd op de virulentiefactoren. Steeds vaker zijn er psychrotrofe stammen bij betrokken en sommige varianten lijken gevaarlijker dan andere. Dit micro-organisme houdt bijgevolg een hoger risico in dan wat er vroeger terzake beschreven is en dit geldt voor een hele reeks voedingsmiddelen (producten van plantaardige oorsprong zoals rijst, graangewassen, pasta's, fruitsappen maar ook gebakjes en kant-en-klare gerechten).

Naar aanleiding van een adviesaanvraag van DG4 van de FOD "Volksgezondheid" in juni 2007, acht de HGR het dus belangrijk en opportuun dat de bevoegde overheid microbiologische criteria uitwerkt gebaseerd op de laatst beschikbare gegevens om de consument te beschermen. Het is tevens van belang te beklemtonen dat nieuwe wetenschappelijke gegevens over *Bacillus* voortaan beschikbaar zijn en men hiermee rekening moet houden om de voor het risicobeheer terzake geschikte opties te bepalen.

1.2 Doelstellingen van de gekozen aanpak

De doelstelling van de door de HGR gekozen pro-actieve aanpak bestaat erin om de opties inzake risicobeheer die de overheid kan nemen, wetenschappelijk te ondersteunen, bijvoorbeeld door het Belgische standpunt in het kader van de bepaling of de herziening van criteria bij de consumptie en/of in de productie-/transformatieketen (criteria in het in uitwerking zijnde ontwerp van EG-verordening, performantiedoelstellingen in de *Codex Alimentarius*) conform de volksgezondheidsdoelstellingen te verdedigen.

In verband met de impact op de volksgezondheid beogen deze aanbevelingen eveneens het bepalen van het meest geschikte beschermingsniveau t.o.v. deze kiem voor de gebruiker om die bronnen van voedseltoxi-infecties beter te beheren.

Bij de gevolgde aanpak werd er in de mate van het mogelijke getracht om zo goed mogelijk de principes en de methodologie van de *Codex Alimentarius* en EFSA te volgen.

1.3 Methodologie

Van bij het begin waren de deskundigen van de HGR van oordeel dat het aangewezen was om een verfijnde synthese van de gegevens en de stand van de huidige kennis inzake dit micro-organisme uit te werken op basis van de huidige wetenschappelijke literatuur. Deze grondige

synthese van de situatie werd uitgevoerd met het oog op de uitwerking van een advies ten behoeve van de bevoegde overheidsinstanties (om aan de verwachtingen en de specifieke bezorgdheid van de FOD te beantwoorden).

Hier toe is een specifieke subgroep van deskundigen inzake microbiologie van de voeding en inzake *Bacillus* bijeengekomen om een omstandig verslag in het Engels over de specifieke problematiek van *Bacillus* spp. in voedingsmiddelen (cf. **Bijlage**: “*Risk profile of the Bacillus cereus Group implicated in foodborne infections*”) uit te werken.

De nadruk werd o.a. gelegd op de toxines die verantwoordelijk zijn voor diarree en op het emetische toxine als virulentiefactoren. Een hoofdstuk werd gewijd aan de indeling, de groeifactoren en de opsporingsmethoden. Voor de indeling van de *Bacillus*-species verdient het de voorkeur de virulentiefactoren eerder dan de taxonomie als basis te nemen. De problematiek van het cereulide heeft het voorwerp van bijzondere aandacht uitgemaakt.

In België zijn er weinig epidemiologische gegevens. De situatie is in Nederland daarentegen (wegens de voedingsgewoonten) veel meer bestudeerd. Over meer gegevens beschikken op nationaal niveau zou werkelijk zeer interessant zijn (objectief belang van de jaarlijkse toxi-infecties door *B.cereus*).

Gelet op de talrijke leemten in de noodzakelijke en beschikbare wetenschappelijke kennis om een formele risico-evaluatie uit te voeren, hebben de deskundigen van de HGR veeleer geopteerd voor een “*risk profile*”-aanpak die hun geschikter lijkt dan de kwantitatieve benadering eigen aan een risicobeoordeling. Het is de bedoeling de recente, praktische en concrete gegevens te verzamelen om vervolgens een beheersingsstrategie te kunnen voorstellen.

Men moet tevens weten dat men zich op Europees niveau (EG-verordening Nr.1441/2007 houdende wijziging van de EG-verordening Nr.2073/2005 betreffende de microbiologische criteria) beperkt tot het voorstellen van een proceshygiëncriterium (*process hygiene criteria*) in poedermelk voor zuigelingen en zeer jonge kinderen. Op Europees niveau heeft de bepaling van microbiologische criteria voor deze kiem in andere voedingsmiddelen tot nu toe geen voldoende steun ontvangen.

2. BESLUITEN VAN HET WETENSCHAPPELIJKE VERSLAG

Aan de hand van het risicoprofiel uiteengezet in het wetenschappelijk rapport (in bijlage) en de verschillende punten aangehaald in dit document, kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Het is een uitdaging om de sporenvormer *Bacillus cereus* in de voedselketen te beheersen, omdat het om een groep van micro-organismen gaat die in het algemeen overal in de omgeving aanwezig zijn en een grote genetische en fenotypische (emetische en diarreeveroorzakende stammen; mesofiele, psychrotolerante en thermotolerante stammen) verscheidenheid vertonen, en omdat de hierbij betrokken categorieën voedingsmiddelen zeer heteroog zijn.
- *B.cereus* sporen (overlevingsvormen) kunnen ook ontkiemen tot vegetatieve cellen die kunnen groeien en toxines produceren tijdens de bewaring van bepaalde types voedingsmiddelen waaronder vooral de mild verhitte voedingsmiddelen met gekoelde bewaring en de gedroogde levensmiddelen voor reconstituering of rehydratatie.
- Hoewel een besmettingsniveau van minstens 10^4 kolonievormende eenheden (kve) per ml of gram levensmiddel als potentieel gevaarlijk wordt beschouwd, ontbreken kritische gegevens om het exacte kve-niveau te bepalen dat tot een voedselvergiftiging kan leiden. Het verschijnen van de symptomen wordt niet alleen in verband gebracht met de hoeveelheid aanwezige *B.cereus*, maar er zijn drie variabelen die een gelijkaardige rol spelen: de genetische achtergrond van de *B.cereus* stam (pathotypes), het voedingsmiddel (type en bewaaromstandigheden) en de gastheer (de persoon die het besmette voedingsmiddel heeft ingenomen).
- De productie van toxines wordt niet alleen door de genetische achtergrond van de stam beïnvloed, maar ook door zijn omgeving (voedingsmiddelen). De mechanismen die de productie van de enterotoxines (diarreesymptomen) of van het cereulide toxine (braaksymptomen) reguleren, zijn evenwel tot op vandaag nog onvoldoende gekend.
- De psychrotolerante *B.cereus* stammen (nu herbenoemd tot *Bacillus weihenstephanensis* voor het merendeel van dergelijke stammen) komen het meest voor als contaminanten van gekoelde voedingsmiddelen, terwijl vooral de mesofiele stammen verantwoordelijk zijn voor de uitbraak van een voedselvergiftiging. Onlangs werden echter psychrotolerante emetische stammen ontdekt, wat betekent dat een bijzonder grote waakzaamheid aan de dag moet worden gelegd. Het belang van de psychrotolerante stammen voor voedselvergiftiging dient verder onderzocht te worden.
- Er zijn vooralsnog geen aanwijzingen dat een specifiek diarreeveroorzakend pathotype van de *B.cereus* groep dominant is bij episodes van voedselvergiftiging.
- Aangezien een *B.cereus* stam meerdere toxines kan produceren, is het noodzakelijk onze kennis te vergroten omtrent de prevalentie van toxinegenen bij meerdere stammen en species van de *B.cereus* groep.
- Dankzij de kennis die men de laatste jaren heeft verworven over de emetische stammen van *B. cereus*, konden hiervoor opsporingsmethoden op punt worden gesteld. Het onderzoek ivm diarreeveroorzakende enterotoxines wordt echter belemmerd door het gebrek aan betrouwbare en reproduceerbare kwantitatieve en kwalitatieve opsporingsmethoden.
- Bij een epidemische uitbraak, is het belangrijk dat microbiologische en moleculaire analysemethoden worden toegepast – ongeacht het soort van symptoom – op verschillende kolonies afgepikt van de isolatiebodem. Meer specifieke voedingsbodems of testen moeten ontwikkeld worden om belangrijke types (patho- of fenotype) te isoleren of te herkennen.

- Er moet absoluut herhaald worden dat de taxonomie van de *Bacillus cereus* groep zeer complex is wat de identificatie van de tot deze groep behorende species (o.a. *B. cereus* en *B. weihenstephanensis*) sterk bemoeilijkt. Daarnaast zijn een definitie en de bepaling van genotypes, pathotypes en fenotypes belangrijk.
- Het is absoluut noodzakelijk dat *Good Manufacturing Practices* (GMP) en HACCP bij de productieprocessen correct toegepast worden om de aanwezigheid van *B.cereus* in de risicovoedingsmiddelen (o.a. gepasteuriseerde of gekookte en gekoelde voedingsmiddelen of gedehydrateerde levensmiddelen) te beperken.
- Rekening houdend met de verplichting voor de operatoren om een beheersysteem voor de voedselveiligheid uit te werken, is het belangrijk dat deze operatoren een plan opstellen voor de evaluatie van *B.cereus* als microbiologisch risico in bepaalde voedingsmiddelen. Om *B.cereus* op een correcte manier te controleren is het onontbeerlijk om de doeltreffendheid van de controlemaatregelen te kunnen nagaan en te valideren.
- Vandaag blijkt het meest effectieve beheersysteem om *B.cereus* in de voedselketen te controleren, het strikt naleven van lage temperaturen ($\leq 7^{\circ}\text{C}$) gedurende de volledige keten (proces, bewaring, transport) door de verschillende operatoren (producent, groothandelaar, kleinhandelaar) en de consument.
- Het wordt uitdrukkelijk aangeraden, vooral voor de emetische stammen, om gekookte voedingswaren niet buiten de koelkast te bewaren of deze voor een korte periode niet bloot te stellen aan ongeschikte temperaturen ($>10^{\circ}\text{C}$). Om de groei van emetische stammen te voorkomen is het noodzakelijk dat voorgekookte producten snel afkoelen door ze in kleine porties op te delen.
- Bij de opslag en de bewaring van voedingsmiddelen kan de groei van *B.cereus* mogelijk belemmerd worden door de productie van niet-pH-neutrale voedingsmiddelen of door de ontwikkeling van samenstellingen van voedingsmiddelen volgens de hordentechnologie. Meer onderzoek hierover is nodig.
- In navolging van de Verordening van de Commissie 1441/2007, tot wijziging van Verordening nr. 2073/2005, worden de voedingsmiddelen bestemd voor zuigelingen beschouwd als hoog risicoproducten (rekening gehouden met de groei van *B.cereus* in dit type producten en het specifieke karakter van deze groep consumenten).
- In tegenstelling tot de wetenschappelijke evaluatie door EFSA inzake gebruik van probiotica in de diervoeding, bestaat er nog geen specifieke regelgeving voor het gebruik van *B.cereus* als probioticum in de menselijke voeding. Voorbereidende stappen hieromtrent (wetenschappelijke aanbevelingen en een wettelijk kader) worden aangemoedigd.

3. SITUATIE IN BELGIE

B.cereus als humane voedselpathoogeen

B.cereus komt wijdverspreid voor in het milieu, en behoort tot een groep van nauwverwante sporenvormende species die algemeen bekend staat als de *B. cereus* groep. Tot deze groep behoren de species *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* en *B. pseudomycoides*. *B. cereus* is een voedselgebonden pathoogeen die twee verschillende ziektebeelden kan veroorzaken bij consumptie van o.a. zetmeelhoudende spijsen, rijst, melk, groentepurees of kruiden door verschillende toxines: een emetisch type en een diarree type (Granum, 1997). Een acuut intoxicatie effect in de vorm van misselijkheid en braken (emetisch type) wordt veroorzaakt door de opname van het toxine cereulide (intoxicatiedosis ca. 8 µg/kg lichaamsgewicht) dat meestal in zetmeelhoudend voedsel (pasta en rijst) wordt geproduceerd.

Daarnaast wordt er gesuggereerd dat de diarreesymptomen (incubatieduur van 6 tot 18u) optreden door opname van voedsel besmet met hoge aantallen levende *B. cereus* sporen of vegetatieve cellen (10^3 - 10^5 kolonievormende eenheden per gram) en dat toxinevorming optreedt tijdens ontkieming en vegetatieve groei in de dunne darm (EFSA, 2005). Over de dosis-respons relatie voor deze toxico-infectie bestaat echter nog grote onduidelijkheid.

Niettegenstaande dat de *B. cereus* voedselvergiftigingen vaak acute symptomen (braken of diarree) veroorzaken, wordt omwille van het vaak zelflimiterende karakter, de ernst meestal als matig ingeschat en is het gerapporteerde aantal uitbraken duidelijk een onderschatting van het volksgezondheidsprobleem. Daarnaast is evenwel bekend dat het emetische type een dodelijke afloop kan hebben in sommige gevallen (o.a. door acute leverfalen {Dierick, 2005}).

In België werden 22 voedselgebonden *B. cereus* uitbraken (waarvan 13 met het diarreetype) gerapporteerd in de laatste 6 jaar wat resulteerde in 386 ziektegevallen, 21 hospitalisaties en 3 overlijdens (K. Dierick – WIV, pers. med., 2009).

Er is een discrepantie in het feit dat autoriteiten voor de volksgezondheid een duidelijk onderscheid maken tussen *B. cereus* s.s., zijnde een potentiële voedselvergiftiging veroorzakende pathoogeen van klasse 2, en de andere species van de *B. cereus* groep, terwijl de internationaal aanvaarde ISO 7932 standaardmethode en andere routinemethodes geen onderscheid kunnen maken tussen de verschillende species van de *B. cereus* groep.

B. cereus toxines: structuur, detectie, voorkomen en vorming

Cereulide is een klein ringvormig peptidotoxine dat hittestabiel en resistent is tegen extreme pH en proteolytische activiteit in de maag waardoor het zonder verlies van zijn biologische activiteit in de darm terechtkomt. Het wordt gevormd door een specifieke klonale groep van mesofiele *B. cereus* stammen tijdens temperatuursmisbruik (bewaring bij 10-30°C) van vooral zetmeelhoudende producten (rijst of pastaschotels) (Carlin *et al.*, 2006). Zeer onlangs werd de productie van cereulide ook waargenomen bij psychrotrofe stammen van *B. weihenstephanensis* (Hoton *et al.*, 2009). Dit toxine kan niet immunologisch opgespoord worden, maar er bestaan recentelijk kwantitatieve assays waaronder een *boar semen* beweeglijkheidstest (Rajkovic *et al.*, 2006b). Via PCR kan het verantwoordelijke plasmidegebonden peptidessynthetasegen (*ces*) opgespoord worden (Hoton *et al.*, 2005; Ehling-Schulz *et al.*, 2005).

Daarnaast kan een groot deel van de *B. cereus* stammen één of meerdere diarree veroorzakende toxines produceren (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Er is het Haemolysin BL (HBL) dat bestaat uit 3 proteïnecomponenten, B, L₁ en L₂ (gecodeerd door *hblC*, *hblD*, *hblA* operon), die alle drie nodig zijn voor maximale toxineactiviteit. Het complex Nhe dat tevens bestaat uit drie proteïnen (gecodeerd door *nheA*, *nheB*, *nheC* operon) die alle drie nodig zijn voor volledige enterotoxineactiviteit is eveneens wijd verspreid (Swiecicka *et al.*, 2006). De diarreeveroorzakende toxines zijn hittelabel en worden geïnactiveerd door zure pH en

proteolytische enzymen in de maag. Hierdoor speelt opname van deze toxines via voedsel normaal gezien slechts een geringe rol, maar is het de vorming van deze enterotoxines in de dunne darm die de diarreesymptomen veroorzaakt.

Naast PCR-detectie van de coderende genen, bestaan er commerciële tests voor beide diarreeveroorzakende toxines (BCET RPLA test van Oxoid[®] voor Hbl-toxine en BDE ELISA van Tecra[®] voor Nhe-toxine), maar in beide gevallen wordt slechts één van de drie proteïnecomponenten enkel kwalitatief opgespoord en wordt voor de laatste test ook kruisreactiviteit gemeld. Dit beperkt sterk de waarde van deze tests (o.a. Moravek *et al.*, 2006).

Monoclonale antilichamen voor enterotoxine HBL of Nhe zijn beschreven (o.a. Dietrich *et al.*, 2005), maar zijn niet vrij of commercieel beschikbaar. Naast deze twee enterotoxinecomplexen is er ook nog sprake van een enterotoxine T (*bceT*), cytotoxine K (*cytK*) en een enterotoxine FM (*entFM*). Enkel van het cytotoxine K (gecodeerd door *cytK*), een enkelvoudig eiwit, is via een zeer ernstige voedseluitbraak met fatale afloop aangetoond dat het geïmpliceerd is in voedselvergiftiging (Lund *et al.*, 2000). Ondertussen zijn er 2 vormen, CytK₁ en CytK₂, beschreven, waarvan het eerste zeer toxisch is voor humane epitheelcellen en het tweede meer algemeen voorkomt (Fagerlund *et al.*, 2004).

Voor het cytotoxine K eiwit is er nog geen detectiemethode beschreven.

Uit een recente studie op 411 *B. cereus* stammen en 205 *B. thuringiensis* stammen (uit voeding of bodem) blijkt dat in 65 % van de stammen alle acht toxinegenen hierboven vermeld (*hbl* en *nhe* operon, *cytK*, *entFM*) aanwezig waren, dat het *hbl* operon significant meer aanwezig was in *B. thuringiensis* (86 %) dan in *B. cereus* (66 %), maar dat voor de andere toxinegenen er geen significante verschillen waren, en dat het *nhe* operon en *entFM* aanwezig waren bij alle onderzochte stammen, terwijl het *cytK* gen aanwezig was bij 83 à 89 % van de stammen (Ngamwongsatit *et al.*, 2008). Daartegenover is slechts een klein aantal stammen positief voor cereulideproductie (bv. 8 % in voeding in Nederland (Wijnands *et al.*, 2006a) of ook 1 tot 2 % in een verzameling van meer dan 2.000 stammen (Hoton *et al.*, 2009). De enterotoxinegenen van *B. cereus* vertonen een hoge graad van polymorfismen (Ehling-Schulz *et al.*, 2006).

Zeker voor de enterotoxines is echter de loutere aanwezigheid van de toxinegenen niet voldoende om het pathogeen karakter van de stam te voorspellen: dit is in belangrijke mate afhankelijk van de genetische achtergrond van de stam en de omgevingsomstandigheden. Zo werden grote verschillen in de productie van de toxinecomponenten HBL-L₂ en NheB vastgesteld waarbij stammen uit voedselvergiftigingen gemiddeld gezien significant meer NheB produceren dan voeding/omgevingsstammen (Moravek *et al.*, 2006). Het niveau van Nhe productie zou dus grotendeels de cytotoxische activiteit van *B. cereus* kunnen verklaren en zou een indicatie van een hoog diarreeveroorzakend potentieel kunnen vormen.

De regulatie van enterotoxinevorming is zeer complex waarbij verschillende transcriptionele regulatoren betrokken zijn. De expressie van de enterotoxinegenen coderend voor Nhe, HBL en CytK wordt in sterke mate opgeregeerd door het PlcR-PapR *quorum sensing system* (Gohar *et al.*, 2008), maar voor Nhe en HBL ook door andere omgevingsafhankelijke systemen zoals de redoxregulatoren ResDE en Fnr (Duport *et al.*, 2006; Zigha *et al.*, 2007), die ook de fermentatieve groei van *B. cereus* reguleren en op zijn minst partieel onafhankelijk van PlcR zouden kunnen werken. Daarnaast blijkt *hbl* en *nhe* operon expressie geremd te worden door de katabolische regulator CcpA, die ook het glucosemetabolisme controleert (van der Voort *et al.*, 2008). Deze gegevens komen overeen met de dubbele vaststelling dat zowel de groeisnelheid als de suikerbron de *B. cereus* enterotoxineproductie beïnvloeden, waarbij o.a. sucrose de Nhe productie verhoogt (Ouhib *et al.*, 2006), en dat een lage redoxpotentiaal de enterotoxineproductie (vooral HBL) stimuleert (Zigha *et al.*, 2006).

De *B. cereus* groep: taxonomie en diversiteit

De taxonomie van de *B. cereus* groep is complex en controversieel omdat de discriminerende fenotypische kenmerken tussen de verschillende species niet stabiel zijn of de genetische determinanten ervan kunnen uitgewisseld worden ook in voedingsmatrices (Van der Auwera *et al.*, 2007). Omwille van klinische of economische redenen worden de aparte species momenteel toch behouden. Sinds 1998 is *B. weihenstephanensis* bij de *B. cereus* groep toegevoegd om de psychrotolerante stammen (groeien nog onder 7°C) te omvatten in een apart species. Nadien is gebleken dat niet alle psychrotolerante stammen systematisch behoren tot dit species en dat een specifieke *B. weihenstephanensis* stam althans *in vitro* hoog cytotoxisch is (Stenfors & Granum, 2001). In het kader van een gekoelde voedselketen zijn het vooral de psychrotolerante stammen die nadelige economische implicaties kunnen hebben (Thorsen *et al.*, 2009; Arnesen *et al.* 2007; Valero *et al.* 2007). De ontwikkeling van gemaksvoeding (minimaal behandelde gerechten met verlengde houdbaarheid in de koeling) creëert mogelijks een niche voor dergelijke psychrotolerante stammen.

De vraag stelt zich of deze psychrotolerante stammen, gezien hun tragere groei bij 37°C (dunne darm temperatuur) een even groot risico betekenen voor voedselvergiftiging en welk contaminatieniveau van deze psychrotolerante *Bacillus* flora (bederfflora bij producten onder koeling bewaard) nog verantwoord is in het kader van de volksgezondheid. Uit een modelsysteem voor passage van sporen door de maag en kieming/groei in de dunne darm bleek dat mesofiele *B. cereus* stammen beter dan psychrotolerante stammen kiemen en uitgroeien in het gedefinieerde simulatiemedium van de dunne darm (Wijnands *et al.*, 2006b). Ook het voedseltype en de stamspecificiteit blijken een rol te spelen voor groei en HBL productie in dunne darm simulaties (Clavel *et al.*, 2007). Er moet in verder onderzoek met dunne darmsimulaties ook gekeken worden naar de relatie tussen specifieke kiemaantallen, het pathotype en volledige enterotoxineproductie en ook rekening gehouden worden met de specifieke ecologie (competitieve microbiota en anaërobe omstandigheden) van het gastro-intestinaal systeem.

Uit een recente studie van de populatiestructuur blijkt dat de *B. cereus* groep kan ingedeeld worden in zeven grote genetische groepen die overeenstemmen met ecotypes op basis van habitats en/of temperatuurslimieten voor groei en die mogelijks een verschillend pathogeen potentieel hebben: zo zijn de psychrotolerante stammen verdeeld over twee genetische groepen, maar met een ongelijke distributie van isolaten uit voedselvergiftigingen (Guinebretière *et al.*, 2007).

Deze genetische indeling kan de basis vormen voor de definitie van pathotypes (i.e. de stammen of types die een gevaar betekenen voor de volksgezondheid); hiervoor is een verdere karakterisering (o.a. op het niveau van de diversiteit van toxinegenen en hun regulatoren) noodzakelijk. In een later stadium zou een specifieke detectiemethodologie voor deze pathotypes kunnen worden overwogen.

Voorkomen van *B. cereus* in voeding

B. cereus produceert hitteresistente sporen, die verhittingsprocessen (pasteurisatie) of droogprocessen in de voedingsindustrie overleven en die door hun hydrofoob karakter biofilms in proceslijnen kunnen vormen of initiëren. Door pasteurisatie worden de sporen geactiveerd om te ontkiemen en onder gunstige omstandigheden (bv. rehydratie) opnieuw als vegetatieve cellen uit te groeien; door eliminatie van de niet-hitteresistente begeleidende microbiota hebben de sporenvormers zelfs een competitief voordeel in hittebehandelde voedingsproducten. Langdurige gekoelde bewaring van hittebehandelde voedingsproducten en levensmiddelen leidt daarenboven tot een specifieke uitgroei van psychrotolerante stammen. Bijgevolg vormen verhitte voedingsproducten zoals gepasteuriseerde zuivelproducten, Chinese rijstschotels en de zogenaamde REPFED's (*Refrigerated Processed Foods of Extended Durability*), waartoe voorgedroogde gekoelde bereidingen en kant-en-klaarmaaltijden behoren, de gedroogde

producten zoals zuigelingenvoeding, kruiden en specerijen, gedehydrateerde soepen en paddestoelen, rijst, granen en pasta, en ook voorverpakte groenten en fruit waaronder gespruite zaden, tot de hoge risicoproducten.

Behalve voor gedroogde volledige zuigelingenvoeding en gedroogde dieetvoeding voor medisch gebruik voor zuigelingen < 6 maanden (Verordening EG nr. 1441/2007 proceshygiëncriterium), bestaan er nog geen wettelijke microbiologische criteria voor *B. cereus* in deze risico-voedingsproducten.

4. PERSPECTIEVEN EN EERSTE AANBEVELINGEN VOOR HET ONDERZOEK

De Hoge Gezondheidsraad vestigt de aandacht van de bevoegde Overheden op de talrijke leemtes en ontbrekende kennis in verband met *B.cereus* en op de perspectieven inzake onderzoeksprojecten die deze naar voren gebrachte leemtes zouden kunnen invullen:

- **Het toxine cereulide en de enterotoxinen:** het nodige onderzoek aanmoedigen om de dosis/respons-relatie nauwkeurig te kunnen bepalen in het kader van toxi-infecties.
- **Onder-rapportering:** een methodologie uitwerken om duidelijk te kunnen bepalen tot welk species van de *B.cereus* s.s groep de betrokken *Bacillus* bij een episode van erkende voedselvergiftiging behoort.
- **Validiteit van de testen** (kruisreactiviteit): op nationaal niveau het onderzoek aanmoedigen en bevorderen om testen te ontwikkelen die de opsporing en het onderscheid van enterotoxinen toelaten.
- **De toxinecomponenten (zoals NheB):** onderzoeksprotocollen uitwerken om deze te kunnen kwantificeren (de stammen met hoog diarreevermogen kenmerken en deze van de omgevingsstammen onderscheiden).
- **De transcriptionele regulatiemechanismen** (suikers, redoxpotentiaal): de huidige kennis ontwikkelen en verfijnen (om eventueel preventiemaatregelen te kunnen opstellen).
- **De risico-evaluatie:** het maximum contaminatieniveau door psychrotolerante stammen bepalen (bederfflora bij producten onder koeling bewaard) dat het risico tot een aanvaardbaar niveau voor de volksgezondheid kan verminderen.
- **De invloed van darmecologie op de differentiële expressie van enterotoxinen:** het onderzoek aanmoedigen om door dunne darmsimulaties een beter inzicht te hebben op de ecologie van *B. cereus* en in het bijzonder van de diarreeveroorzakende pathotypes ervan in het gastro-intestinaal systeem. Deze benaderingen laten toe het vermogen om verschillende enterotoxines te produceren, te evalueren rekening houdende met parameters zoals de microbiële densiteit en diversiteit of de fysisch-chemische condities in de darm.
- **De pathotypes:** het onderzoek aanmoedigen om de verdere karakterisering van de genetische diversiteit van de stammen en/of pathotypes te bepalen welke een gevaar voor de volksgezondheid inhouden. Een detectie- en onderscheidingsmethodologie voor deze pathotypes zou op middellange termijn tot stand moeten komen.
- Werken aan het bepalen van een **microbiologisch voedselveiligheids criterium** voor *B.cereus* in risicovoedingsmiddelen op basis van de nieuwe beschikbare wetenschappelijke gegevens.

5. REFERENTIES

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, Timmerly 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. BIJLAGE

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

Hebben aan het opstellen van het verslag deelgenomen: Andreja Rajkovic, Mieke Uyttendaele*, Katelijne Dierick*, Simbarashe Samapundo, Jean-Jacques Dubois, Georges Daube*, Jacques Mahillon* & Marc Heyndrickx*.

Marc Heyndrickx heeft de rol van verslaggever-coördinator vervuld.

Dit wetenschappelijk rapport zal gepubliceerd worden in twee wetenschappelijke tijdschriften. Gedurende de periode voorafgaand aan de publicatie, is dit rapport uitsluitend ter plaatse consulteerbaar in de lokalen van de HGR. Na publicatie zal het wetenschappelijk rapport zich in bijlage van dit document bevinden.

7. SAMENSTELLING VAN DE WERKGROEP

Al de deskundigen hebben **op persoonlijke titel** aan de werkgroep deelgenomen. De namen van de deskundigen van de HGR worden met een asterisk * aangeduid.

De volgende deskundigen hebben hun medewerking verleend bij het opstellen van het advies:

DAUBE Georges*	(Microbiologie van de voeding; ULg)
DE SCHRIJVER Koen*	(Epidemiologie; UA)
DE ZUTTER Lieven*	(Microbiologie van de voeding; UGent)
DIERICK Katelijne	(Microbiologie van de voeding; WIV-ISP)
GEERAERD Annemie*	(Microbiologie van de voeding; KULeuven)
HEYNDRICKX Marc*	(Microbiologie van de voeding; ILVO)
HOUF Kurt*	(Microbiologie van de voeding; UGent)
MAHILLON Jacques*	(Microbiologie; UCL)
MELIN Pierrette*	(Medische microbiologie; ULg)
MICHIELS Chris	(Microbiologie van de voeding; KULeuven)
NOIRFALISE Alfred*	(Toxicologie en bromatologie; ULg)
PIERARD Denis*	(Medische microbiologie; VUB)
RAJKOVIC Andreja	(Levensmiddelenmicrobiologie en –conservering; UGent)
SINDIC Marianne*	(Microbiologie van de voeding; Gembloux Agro-Bio Tech)
THIRY Etienne*	(Diergeneeskundige virologie; ULg)
UYTTENDAELE Mieke*	(Levensmiddelenmicrobiologie en –conservering; UGent)

De administratie werd vertegenwoordigd door Benoît HORION en Isabel DE BOOSERE.

Het voorzitterschap werd verzekerd door Georges DAUBE en het wetenschappelijk secretariaat door Jean-Jacques DUBOIS.